

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 MATERIALES**

#### **4.1.1 MATERIAL VEGETAL**

La planta utilizada, linaloe (*Bursera linanoe*), fue recolectada en el mes de abril de 2011 en Chiautla de Tapia, Puebla. Se obtuvieron tallos de los cuales se utilizaron 2.5 Kg para la investigación.

#### **4.1.2 BACTERIAS**

Se utilizaron microorganismos obtenidos del cepario del laboratorio de microbiología de la UDLAP.

### **4.2 METODOLOGÍA**

#### **4.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS**

El material fue triturado en astillas de aproximadamente 5 cm. Una vez obtenido el tamaño adecuado se procedió a macerarlo durante 3 días en matraces de vidrio de 4 L con 3.5 L de solvente (etanol, hexano, cloroformo o acetato de etilo) cubriendo apenas toda la madera y fuera del contacto con la luz. Este procedimiento se repitió dos veces más para asegurar la mayor obtención de compuestos de polaridad afín a cada solvente. Después de transcurrido el tiempo se procedió a evaporar el líquido (previamente filtrado al vacío con papel filtro No. 4 marca Whatman) a sequedad en rotavapor marca Büchi modelo R-124.

Después de las primeras pruebas de actividad antimicrobiana sólo los extractos que mostraron efecto antibacteriano se usaron para aislar los compuestos de interés.

#### **4.2.2 SEPARACIÓN DE EXTRACTOS POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA**

Se tomó una cantidad de entre 0.25 g y 2.0 g de muestra (extracto o fracción activa) y se separaron en una columna cromatográfica utilizando sílica gel 60 (marca J.T. Baker 60-200 mm) en una relación 1:100 con respecto al peso de la muestra a separar. Las columnas se empacaron inicialmente con hexano y se fueron agregando mezclas de hexano-cloroformo, cloroformo-acetato de etilo o hexano-acetato de etilo como fase móvil, colectando fracciones de 20 mL, 500 mL o 1000 mL dependiendo del peso inicial de la muestra.

#### **4.2.3 PREPARACIÓN DE PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

##### *4.2.3.1 Discos y muestras*

Se cortaron discos de papel filtro No. 1 con un diámetro aproximado de 6 mm los cuales fueron esterilizados en autoclave (al igual que todo el material utilizado para este procedimiento).

Cada muestra se resuspendió en 100 µl de cloroformo (extracto o fracción) cuyo peso fuera menor a 0.09 g y 500 µl si éste era mayor; después se tomaron alícuotas de 10 µl para impregnar los discos y se dejaron secar.

Para los extractos en los que después de la separación cromatográfica se obtuvieron más de 10 fracciones por polaridad, se resuspendió cada fracción en 100 µl de cloroformo; se agruparon en muestras globales ("pool") tomando alícuotas de 10 µl de cada una. De esta mezcla se tomaron alícuotas de 10 µl para impregnar cada disco y se dejaron secar.

##### *4.2.3.2 Pruebas de actividad antimicrobiana*

Se utilizaron bacterias obtenidas del cepario de la UDLAP (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*). Cada una fue sembrada 24 hr. antes de la realización de las pruebas correspondientes. Se prepararon suspensiones de cada bacteria ajustada a una concentración de 0.5 de Mac Farland., se sembraron en las placas con medio de cultivo (agar Müller-Hinton marca Bioxon®), se dejaron secar los discos

impregnados con las diferentes fracciones o mezclas de fracciones, y después se colocaron a las placas. Estas se dejaron incubar a 37 °C durante 24 hr. Después de transcurrido el tiempo establecido se sacaron para observar los resultados de las pruebas. Se consideraron resultados positivos a la aparición de un halo de inhibición con una medida igual o mayor a 7 mm.

#### **4.2.4 PURIFICACIÓN POR CRISTALIZACIÓN**

Las muestras que mostraron actividad biológica se disolvieron en 0.5 mL de metanol y se pusieron en baño María durante una hora para optimizar la disolución de la muestra en el solvente. Posteriormente se taparon adecuadamente y se refrigeraron 24 horas a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 mins a 4°C después separar el precipitado por decantación. Se obtuvieron los espectros de RMN <sup>1</sup>H de ambas fases y posteriormente se hicieron las pruebas de actividad antimicrobiana en disco.

#### **4.2.5 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)**

Los espectros de RMN se determinaron en soluciones de cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) empleando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los datos de RMN de <sup>1</sup>H se midieron a 200MHz. El instrumento utilizado fue un espectrómetro Varian Mercury L600.