

6 DISCUSIÓN

Se obtuvieron cuatro extractos diferentes de la misma planta con características físico-químicas similares por medio de maceración de las astillas con hexano, cloroformo, etanol y acetato de etilo de los cuales se obtuvo un buen rendimiento.

Los espectros de RMN ^1H de los extractos muestran señales diversas e indefinidas, producto de la mezcla de los compuestos que contienen, sin embargo se puede deducir la presencia de varios componentes tales como terpenos y alcoholes principalmente.

Los resultados de las primeras pruebas de actividad biológica para el extracto de acetato de etilo y de hexano mostraron indicios de efecto inhibitorio frente a las bacterias utilizadas, que dieron pie a continuar la investigación con el extracto de acetato de etilo que dio los mejores resultados de inhibición bacteriana.

Desafortunadamente, en cuanto a la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y clorofórmico los resultados fueron negativos para todas las pruebas realizadas por lo que se detuvo la investigación posterior correspondiente, y en cuanto al extracto hexánico, a pesar de presentar actividad inhibitoria, la contaminación mostrada en los espectros de resonancia evitó continuar con los análisis del mismo.

Las fracciones del extracto de acetato de etilo obtenidas por la cromatografía de columna tuvieron una gran diferencia de peso una de la otra sin mostrar una dependencia a la polaridad con las que se les obtuvo, asimismo, en las pruebas de actividad antimicrobiana, inicialmente la diferencia entre diámetros de inhibición parece no depender de algún factor en especial.

Para las primeras pruebas de actividad antibiótica, realizadas a las fracciones obtenidas de la separación de 0.25 g de extracto de acetato de etilo, se puede

observar que el microorganismo más susceptible en este caso fue *S. aureus* siendo afectado por cinco fracciones de once totales, mientras que la cepa que mostró resistencia absoluta fue *E. aerogenes*.

Asimismo se notó un efecto en el crecimiento de *P. aeruginosa* el cual fue inhibido sólo por las fracciones 7:3 y 6:4 de esta etapa, afectando de la misma manera sobre el crecimiento de *E. faecalis* que fue afectado en mayor medida por estas mismas muestras. El resto de las diferentes fracciones no afectaron el desarrollo natural de estas dos bacterias.

La actividad mostrada frente a los organismos Gram positivos utilizados en esta investigación, sugiere que los componentes aislados son de naturaleza poco polar a intermedia, ya que las principales fracciones activas frente a éstos fueron 7:3 y 6:4 para ambos casos, siendo mayoritario el hexano. En cuanto a los microorganismos Gram negativos, las únicas fracciones activas demostraron, una vez más, una tendencia no polar, sin embargo, en este caso, el efecto sólo causó un impacto moderado en *P. aeruginosa*, siendo las fracciones 7:3 y 6:4, nuevamente, las que tuvieron un mejor desempeño frente a esta bacteria.

Se puede observar que la actividad mostrada frente a *S. aureus* correspondió a las fracciones obtenidas principalmente donde el solvente no polar (hexano) fue mayoritario; así mismo, el diámetro del halo de inhibición parece aumentar a medida que se aumenta la polaridad de la fase móvil, agregando mayor cantidad de acetato de etilo. Sin embargo, cuando se alcanza una relación 1:1 en los eluyentes, el halo disminuye en gran medida, y al aumentar aún más dicha polaridad, comienza a decrecer esta actividad hasta desaparecer a partir de la proporción 3:7, indicando que los componentes con actividad antimicrobiana probablemente son de origen no polar o con una polaridad intermedia.

Después de la cristalización con metanol, es interesante ver que al separar compuestos cristalizados del sobrenadante, la actividad biológica sólo permanece en el líquido de las fracciones 8:2 y 7:3 frente a *S. aureus* (aunque ésta disminuye considerablemente) y nuevamente el efecto se da en las polaridades en las cuales el solvente menos polar es mayoritario a excepción de la fracción 4:6 donde el

acetato de etilo predomina y cuyo efecto se presenta sin cambios en el diámetro del halo de inhibición. En este último caso, se podría inferir que alguno de los compuestos activos de baja polaridad permanece en la mezcla donde el solvente con mayor polaridad aumenta, manteniendo la actividad biológica de esta fracción a pesar de que en muestras anteriores esta actividad se pierde.

El hecho de que la actividad inhibitoria se deteriora en la fracción 5:5, donde los eluyentes se encuentran en la misma proporción, puede relacionarse con un efecto sinérgico de componentes de ambas polaridades en equilibrio, el cual se pierde totalmente al separarlos por la cristalización.

Para el caso de *P. aeruginosa* y *E. faecalis* se pierde el efecto antimicrobiano de la fracción 7:3 tanto en el sólido como en el líquido, suponiendo de igual manera que sus componentes tienen un efecto sinérgico, que si bien en un principio no es muy potente, se disipa completamente en la separación o incluso por la modificación de alguna molécula activa por la manipulación natural de la muestra.

Por otro lado, curiosamente, se presenta efecto inhibitorio frente a *E. aerogenes*, tanto con el sólido como con el líquido remanente de la cristalización de las muestras 8:2 y 7:3, el cual no había aparecido en las pruebas con las fracciones sin purificar, es decir sin cristalizar. En este caso la separación por cristalización favorece la aparición del efecto antimicrobiano de estas fracciones, siendo los líquidos una vez más, los que mayor efecto obtienen, esto se deba quizá a que se eliminan componentes que interfieren en el efecto de estos compuestos, como lo muestran los espectros de resonancia, en donde se aprecia la disminución o desaparición de señales con respecto a la muestra original de donde se obtienen. Cabe recalcar, que estas fracciones son obtenidas con fase móvil de baja polaridad reafirmando la suposición de que los componentes activos tienen este origen.

Para el resto de las muestras con respecto a esta bacteria el resultado permanece invariable.

Comparando la actividad antimicrobiana de estas fracciones con las de los controles utilizados se puede observar una similitud en la actividad inhibitoria, de hecho, en uno de los casos en donde se utiliza azitromicina como control el efecto antimicrobiano se ve superado por la fracción 7:3 frente a *S. aureus*, el cual fue susceptible ante todos los controles. Para el resto de las polaridades, esta actividad resulta menor.

Por el contrario, para el caso de *P. aeruginosa*, sólo se presenta susceptibilidad ante dos de los controles (gentamicina y ciprofloxacina) donde los halos de inhibición fueron mayores a los obtenidos con las polaridades activas del extracto. Sin embargo, es necesario aclarar que la cantidad en peso seco es mayor para estas fracciones que para los antibióticos probados.

Enterococcus faecalis fue susceptible ante todos los controles, mientras que para las muestras problema sólo dos de ellas afectaron al microorganismo. Sin embargo, el diámetro de inhibición de las muestras activas superó al de la esencia de linalol puro, por lo que estas polaridades resultaron ser más efectivas que esta esencia pura frente a esta bacteria.

Por último, en cuanto al crecimiento de *E. aerogenes*, se tiene que los controles no fueron más efectivos en comparación con las fracciones utilizadas, incluso después del proceso de cristalización. El resto de los casos activos superaron a amickacina, ciprofloxacina y acetato de linalilo, los cuales no mostraron actividad alguna contra esta bacteria, mientras que para esta prueba resultaron ser activas hasta cuatro fracciones.

En la separación de la fracción cuya actividad de inhibición resultó más efectiva, se colectaron fracciones cuyo peso fue independiente de la polaridad con las que se colectaron. En esta ocasión, la muestra con mayor actividad biológica mostrada en las primeras pruebas (6:4) fue la procesada por columna cromatográfica, de la cual se tuvieron resultados diversos.

Se puede observar que la actividad de 8:2 frente a *S. aureus* permanece en dos de sus cinco fracciones, aunque débil pero sigue presente. El efecto frente a *P. aeruginosa* y *E. faecalis* desaparece en esta ocasión, y para *E. aerogenes*

destaca la aparición de efecto antimicrobiano en dos de las fracciones de esta misma polaridad. En el caso de la fracción 7:3, resalta la presencia de inhibición sólo frente a *E. aerogenes* para dos de sus fracciones, y desaparece frente al resto de las bacterias. Una tendencia similar se observa para las fracciones obtenidas con 60% de hexano y 40% de acetato de etilo, donde se obtiene efecto contra *S. aureus* y *E. aerogenes*, por lo que se considera que se volvieron a tener buenos resultados, de hecho, los mejores para esta prueba, son tres fracciones activas, una de ellas (fracción 3) teniendo efecto contra tres microorganismos, incluyendo a *E. aerogenes*, que había mostrado resistencia en un principio frente a la fracción de origen (6:4), aunque esta actividad inhibitoria en general se vio disminuida probablemente por la separación o la disminución en la concentración de la muestra y desapareció completamente frente a *E. faecalis*.

Es notable ver, que estas fracciones pertenecen a polaridades bajas, donde el hexano es el eluyente principal, y cuyos resultados son los mejores en esta prueba, con halos de inhibición mayores a otras polaridades posteriores.

Para la separación obtenida con 50% de cada solvente se produce actividad biológica para dos de las fracciones aunque se nota débil frente a *S. aureus*, pero aparece un poco más potente ahora contra *E. aerogenes*. De igual manera, destaca la desaparición del efecto mostrado en las primeras pruebas frente a *P. aeruginosa* y *E. faecalis*.

Para la polaridad 4:6 también se obtienen resultados para tres fracciones, sin embargo, sólo se generan para *S. aureus* y *P. aeruginosa* de manera poco representativa con halos de inhibición mínimos. En este caso, la actividad mostrada frente a *E. faecalis* se anula y permanece invariable frente a *E. aerogenes*.

Por último, para la polaridad 3:7 sólo permanece inhibición para *P. aeruginosa* con respecto a la fracción de origen (6:4). Para los microorganismos Gram positivos desaparece el efecto y permanece sin cambios en *E. aerogenes*.

Por último, aparece efecto en la primera fracción obtenida con acetato de etilo, la cual presenta actividad inhibitoria frente a *S. aureus* por única ocasión.

Como se puede ver en la tabla 9, a medida que la polaridad de la mezcla del solvente aumenta, el efecto inhibitorio parece disminuir, presentándose halos mínimos y en general para dos de las cinco fracciones colectadas para cada polaridad a partir de la fracción 5:5.

Se debe señalar que, para esta etapa de la investigación, el efecto de las fracciones colectadas muestra una tendencia a afectar a los microorganismos Gram negativos donde por lo menos 11 fracciones de 6 polaridades diferentes tuvieron actividad inhibitoria en ambos microorganismos de este grupo, esto es, la mitad de las polaridades obtenidas en este proceso tuvieron un efecto positivo a pesar de la poca cantidad de muestra utilizada para estas pruebas, lo cual podría indicar la presencia de compuestos activos de potencia considerable.

Para los microorganismos Gram positivos se tiene que, sólo 10 fracciones de 5 polaridades distintas tuvieron actividad antimicrobiana, y solamente frente a una de las dos bacterias de este grupo (*S. aureus*).

En esta prueba se tuvieron resultados favorables para los controles, la mayoría siendo activos frente a cada bacteria a comparación de las fracciones obtenidas. En ningún caso se vio superada la actividad antibiótica (cuando se manifestó) de los controles frente a *E. aerogenes*. Sin embargo, se puede observar que la nula actividad que presentó azitromicina y ciprofloxacina frente a *E. aerogenes* fue opacada por la inhibición presentada por dos fracciones de 8:2, dos fracciones de 7:3, una de 6:4, y dos de 5:5, que si bien no mostraron un halo importante, tuvieron efecto contra este microorganismo.

La separación de 2.0 g del extracto de acetato de etilo donde se obtuvo mayor cantidad de muestra por fracción demostró que la polaridad 8:2 generó actividad antimicrobiana de gran importancia sobre todo frente a *E. aerogenes* cuyo halo de inhibición fue el mayor de toda la investigación. Esta información contrasta en gran manera con las primeras pruebas antibióticas con la misma materia prima, pero con la variación de la cantidad utilizada en la columna para su separación, la cual fue 10 veces mayor que la primera vez donde sólo se tomaron 0.25 g y el efecto para este caso particular aumenta hasta 50 veces considerando que en el primer

experimento no se obtuvo efecto alguno frente a *E. aerogenes*. Este mismo fenómeno sucede para la polaridad 7:3 el cual en un principio tampoco revela actividad frente a este microorganismo, pero al aumentar la cantidad de extracto en la columna, se manifiesta inhibición y en gran medida. Otro resultado destacado es la aparición de halo de inhibición para este proceso, en comparación de la primera experimentación respectiva, para la fracción 8:2 con un diámetro importante, y un aumento del mismo para la 7:3 en la actividad contra *E. faecalis*. No así para *P. aeruginosa* la cual sólo aumenta para 7:3, pero permanece inmutable para 8:2.

Por último, para *S. aureus* el halo aumenta considerablemente para la fracción 8:2, pero sólo ligeramente para 7:3.

Cabe señalar que en esta segunda prueba, la fracción análoga a 6:4 perdió inexplicablemente su actividad, aunque se piensa que esto se debió a la constante manipulación de la muestra en cuestión, provocando la transformación o la pérdida de los compuestos con efecto antimicrobiano.

En esta etapa se aprecia, una vez más, que las fracciones cuyo efecto resaltó en las pruebas corresponden a polaridades bajas, donde el acetato de etilo se encuentra en menor proporción, sustentando la suposición de que los compuestos con efecto antimicrobiano corresponden a bajas polaridades.

En esta ocasión, la fracción 7:3 se comportó como un antimicrobiano de amplio espectro, siendo la única fracción de toda la investigación que inhibió a todas las bacterias utilizadas para las pruebas. Se tienen casos en donde el espectro abarca hasta 3 microorganismos que incluyen tanto a Gram positivos como Gram negativos, sin embargo, sólo se consideró como positivo para amplio espectro a la inhibición de las 4 bacterias.

Los resultados obtenidos por las fracciones activas de esta prueba frente a *S. aureus* se tornan superiores a los obtenidos por los controles, a excepción de ciprofloxacina el cual superó al mayor halo de inhibición obtenido por la polaridad 7:3. En cuanto a *P. aeruginosa* la única fracción activa resultó ser mejor que

azitromicina cuyo halo de inhibición fue menor, y que linalol puro y acetato de linalilo puro, que fueron inactivos.

Por otro lado, las pruebas en *E. faecalis* resultaron favorables para todos los casos en los controles, no obstante, aunque no todas las fracciones mostraron actividad antibiótica, en los casos en los que esta sí se manifestó, fue mayor en relación a los halos obtenidos con acetato de linalilo.

Finalmente, en cuanto a los datos obtenidos para *E. aerogenes*, se tiene que la actividad mostrada por las fracciones eficaces, fue notablemente superior a los controles activos gentamicina y linalol puro, con un halo de inhibición sobresaliente.

Los resultados tan variados con respecto al efecto inhibitorio presentado por cada muestra, pueden explicarse como producto de la concentración de los componentes de las fracciones, la tendencia general sugiere que a mayor concentración de muestra, mayor efecto inhibitorio.

Cabe mencionar, que si bien estos resultados fueron notables, no se debe dejar de lado que las concentraciones de las fracciones utilizadas fueron mucho mayores a las utilizadas en los controles, ya que la cantidad de solvente utilizado para resuspender las muestras no excedió los 500 μl , generando de esta manera, concentraciones del orden de los 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (por citar alguna), lo cual sobrepasa enormemente a la concentración utilizada en los discos control de los antibióticos comerciales (10 μg aproximadamente); por lo que lo conveniente sería realizar una prueba de concentración mínima inhibitoria de estos compuestos, sin embargo, en estos casos no es posible, debido a que las muestras no se encuentran totalmente puras a pesar de los métodos utilizados para este fin.

La identificación de compuestos a partir de los espectros de RMN ^1H de las fracciones muestra variaciones en cuanto a las señales producidas, denotando la presencia de varios grupos aromáticos e hidrocarburos entre los que destacan los terpenos o compuestos olefínicos tales como el linalol o sus derivados. Las purificaciones a las que se sometió el extracto (columna cromatográfica y

cristalización) resultaron poco efectivas, ya que la identificación exacta de compuestos no fue posible en algunos casos, debido a la poca cantidad de muestra colectada, y en otros, a la presencia de numerosos constituyentes que interfirieron en la caracterización. Sin embargo, algunos espectros demostraron tener la presencia de algún derivado de linalol al ser comparado con los obtenidos en la literatura como referencia.

En los espectros de resonancia tampoco pueden identificarse los compuestos responsables de la actividad inhibitoria, ya que, como se puede ver en las tablas de resultados, este efecto fue independiente para cada muestra, por lo que el espectro obtenido para cada fracción activa mostró también variaciones en las señales emitidas, sin poder determinar una tendencia de picos específica para este efecto, incluso en aquellas que mostraron picos similares a los obtenidos por derivados de linalol o su acetato cuya actividad antimicrobiana se encuentra reportada en la literatura.

En general, estos muestran diversas señales en las que predominan los hidrógenos unidos a carbono con oxígeno adyacente, carbonos unidos a oxígeno por medio de dobles enlaces, hidrógenos unidos a oxígenos probablemente en forma de alcohol, carbonos de metilo que se encuentran unidos a otros de alquenos, en otros casos se aprecian señales propias de compuestos aromáticos, carbonos con dobles enlaces y a hidrocarburos sencillos tales como alcanos, alquenos y alquinos.

Es necesario continuar las investigaciones farmacognósticas con respecto al linaloe (*Bursera linanoe*) por la importancia terapéutica que este árbol ha demostrado mediante la extracción de sus diversos metabolitos, de los que se han confirmado actividad antiinflamatoria, y antimicrobiana frente a diferentes microorganismos, por lo menos *in vitro*, que sin duda podría llegar a ser una realidad terapéutica potencial como parte del desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas. Además no se debe olvidar que la producción de este árbol es de suma importancia para la región mixteca ya que es una fuente significativa de ingresos, debido al uso que se le da tanto en la

fabricación de artesanías como en la industria de la perfumería y cosmética. Por tanto, el aumento en la producción de esta planta podrá repercutir en la economía de la zona, mejorándola.