



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
INHIBIDORA DEL SISTEMA DE CENSADO QUÓRUM BACTERIANO, DE LAS
CORTEZAS DE *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. Y *Ceiba* spp.**

**PRESENTA
NAYBI ROSARIO MUÑOZ CAZARES**

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: "ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL SISTEMA DE CENSADO QUÓRUM BACTERIANO DE LAS CORTEZAS DE *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. Y *Ceiba* spp.", realizada por la alumna: Naybi Rosario Muñoz Cazares, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



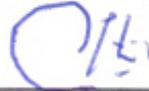
DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR



DR. ISRAEL CASTILLO JUÁREZ

ASESOR



DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

ASESOR



DRA. HEIKE VIBRANS LINDEMANN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre 2013.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de mis estudios de maestría.

Al Dr. Marcos Soto Hernández, por la dirección, invaluable apoyo, confianza e interés en este proyecto.

Al Dr. Israel Castillo Juárez por su amistad, confianza, consejos y apoyo en la realización de este proyecto.

A mi consejo particular por enriquecer este trabajo con sus sugerencias y apoyo.

A la facilidades otorgadas por el Instituto de Química de la UNAM y al laboratorio del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, en particular a la Dra. Silvia Aguilar Rodríguez por su ayuda en el análisis anatómico y a la Universidad Autónoma Chapingo, en particular al Dr. Enrique Guízar Nolasco por su ayuda en la identificación de las especies del género *Ceiba*.

Al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y al laboratorio del Dr. Rodolfo García Contreras, así como al Hospital Infantil de México, Federico Gómez y al laboratorio de Bacteriología Intestinal dirigido por la Dra. Norma Velázquez Guadarrama.

A los integrantes del laboratorio: Sr. Domingo, Maestro Rubén, QFB Victoria González, M. en C. Mariana Palma por su ayuda.

La presente investigación, fue apoyada con recursos derivados de los proyectos PAPITT IN2095512 e Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) PICSA 11-78, así como de Fondos Federales del Hospital Infantil de México, Federico Gómez HIM/2011/081.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y tecnología (COMECYT) por el apoyo parcial a este proyecto.

DEDICATORIA

A mi MAMÁ por estar siempre a mi lado, hemos pasado temporadas buenas, malas pero siempre juntas, este trabajo esta principalmente dedicado a ti.

A mi hermano y Alejandro por la familia que somos.

A mis tías Alejandra y Gabriela por su apoyo y estar siempre presentes.

A ti Daniela, eres como mi hermana, sabes que te quiero, gracias por tu apoyo.

A mi abuela, tíos y primos por tener siempre una palabra de apoyo.

A mis amigas de toda la vida, mejor conocidas como "Thunder Cats", las quiero, gracias por su apoyo y aliento para terminar esta etapa. A ti Yaredi compañera en esta aventura de la maestría, gracias por brindarme tu amistad.

A ti Christopher por darme el empujón e inspiración que me faltaba, cuando te conocí todo fue mucho mejor, te quiero.

A mis amigos de Colegio de Postgraduados, Baltazar, Carlos, Isis, Alejandro, Tania, Gabriel, que hicieron de mi estancia una agradable experiencia.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS.....	i
INDICE DE TABLAS.....	iii
INDICE DE CUADROS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1.INTRODUCCIÓN	1
2.REVISION DE LITERATURA.....	8
2.1. Comunicación bacteriana y sistemas de censado de quórum.....	8
2.2. Productos naturales con actividad inhibidora del sistema de censado de quórum.....	13
2.3. Moléculas con actividad inhibidora del sistema de censado de quórum.....	16
6	
2.4. Mecanismos de inhibición de los sistemas de cesado de quórum bacteriano	188
2.5. <i>Chromobacterium violaceum</i> y la producción de violaceína.....	19
9	
2.6. Descripción botánica y antecedentes de las especies estudiadas.....	20
2.6.1. <i>Amphyterigium adstringens</i>	
<u>2.6.1.1. Taxonomía</u>	20

<u>2.6.1.2. Descripción</u>	21
<u>2.6.1.3. Hábitat y distribución</u>	21
<u>2.6.1.4. Usos y actividad biológica</u>	22
2.6.2. <i>Ceiba pentandra</i>	23
<u>2.6.2.1. Taxonomía</u>	23
<u>2.6.2.2. Descripción</u>	23
<u>2.6.2.3. Hábitat y distribución</u>	24
<u>2.6.2.4. Usos y actividad biológica</u>	24
2.6.3. <i>Ceiba aesculifolia</i>	25
<u>2.6.3.1. Taxonomía</u>	25
<u>2.6.3.2. Descripción</u>	25
<u>2.6.3.3. Hábitat y distribución</u>	26
<u>2.6.3.4. Usos y actividad biológica</u>	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. General.....	27
3.2. Particulares.....	27
4.MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. Obtención del material biológico.....	28
4.2. Obtención de los extractos.....	28
4.3. Métodos de separación.....	29
4.4. Fraccionamiento de los extractos.....	29

4.4.1. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclometánico de <i>Amphipterigyum adstringens</i>	29
<u>4.4.1.1. Purificación e identificación del compuesto aislado del extracto diclorometánico</u>	30
4.4.2. Fraccionamiento de los extractos de las muestras de ceibas.....	31
<u>4.4.2.1. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclometánico de <i>Ceiba aesculifolia</i></u>	31
<u>4.4.2.2. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclometánico de <i>Ceiba pentandra</i></u>	31
<u>4.4.2.3. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclometánico <i>Ceiba sp.</i></u>	31
4.5. Evaluación de la actividad I-SCQ de las fracciones empleando el sistema con <i>Chromobacterium violaceum</i>	32
4.5.1. Cepas bacterianas.....	32
4.5.2. Condiciones de cultivo.....	33
4.5.3. Determinación del crecimiento.....	33
4.5.4. Determinación de la producción de violaceína.....	34
4.6. Modelo de infección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en lesiones producidas por daño térmico.....	34
4.6.1. Inoculo bacteriano.....	35
4.6.2. Inducción del daño térmico e infección con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
4.6.3. Tratamientos.....	36

4.6.4. Identificación y cuantificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en las lesiones.....	36
4.7. Estudio anatómico de las cortezas de ceiba.....	37
4.7.1. Microtécnica.....	38
4.8. Análisis estadístico.....	38
5.RESULTADOS.....	39
5.1. Obtención de los extractos e identificación de la corteza de <i>Amphipterygium adstringens</i>	39
5.1.1. Fraccionamiento del extracto hexánico de <i>Amphipterygium adstringens</i> y su actividad I-SCQ.....	41
5.1.2. Fraccionamiento del extracto diclorometánico de <i>Amphipterygium adstringens</i> y obtención del ácido 3 α -hidroximasticadienónico.....	46
<u>5.1.2.1. Identificación del ácido 3 α-hidroximasticadienónico.....</u>	<u>47</u>
<u>5.1.2.2. Evaluación de la actividad I-SCQ del ácido 3α-hidroximasticadienónico.....</u>	<u>49</u>
5.1.3. Efecto del extracto hexánico de la corteza de <i>Amphipterygium adstringens</i> y una fracción rica en ácidos anacardicos, sobre las lesiones producidas por daño térmico e infectadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
5.2. Identificación de las cortezas del género <i>Ceiba</i> colectadas.....	54
5.2.1. Actividad I-SCQ de los extractos de las tres cortezas de ceiba.....	57
5.2.2. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de <i>Ceiba aesculifolia</i>	59
<u>5.2.2.1. Actividad I-SCQ de las fracciones de <i>Ceiba aesculifolia</i>.....</u>	<u>61</u>

5.2.3. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de <i>Ceiba pentandra</i>	64
<u>5.2.3.1. Actividad I-SCQ de las fracciones de <i>Ceiba pentandra</i></u>	66
5.2.4. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de <i>Ceiba</i> sp.....	69
<u>5.2.4.1. Actividad I-SCQ de las fracciones de <i>Ceiba</i> sp.</u>	71
5.3. Comparación de los metabolitos presentes en las fracciones activas de las cortezas de ceiba.....	74
5.4. Descripción anatómica de las cortezas de ceiba.....	77
6.DISCUSIÓN	85
7.CONCLUSIONES	96
8. LITERATURA CITADA	97

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo general del funcionamiento del censado de quórum.....	8
Figura 2. Principales moléculas autoinductoras.	9
Figura 3. Mecanismo general del funcionamiento del SCQ en bacterias Gram-positivas.....	10
Figura 4. Mecanismo general del funcionamiento del SCQ en bacterias Gram-negativas.....	11
Figura 5. CCF de los extractos de la corteza de <i>Amphipterygium adstringens</i> de referencia y la proveniente del centro de distribución.....	40
Figura 6. CCF de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de <i>Amphipterygium adstringens</i>	43
Figura 7. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de <i>Amphipterygium adstringens</i>	45
Figura 8. RMNH ¹ 3 α -hidroximasticadienónico (compuesto 1).....	48
Figura 9. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína del ácido 3 α -hidroximasticadienónico.....	50
Figura 10. Efecto del EH sobre las lesiones producidas en el modelo de daño térmico y el estado general de los animales.....	52
Figura 11. Cuantificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en lesiones de los animales a los 12 días post-infección.....	54
Figura 12. Comparación de constituyentes químicos de las cortezas de <i>Ceiba</i>	56

Figura 13. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de los extractos de <i>Ceibas</i>	58
Figura 14. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico y diclorometánico de <i>Ceiba aesculifolia</i>	63
Figura 15. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico y diclorometánico de <i>Ceiba pentandra</i>	67
Figura 16. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico y diclorometánico de <i>Ceiba sp</i>	73
Figura 17. CCF de las fracciones activas obtenidas del extracto hexánico de <i>Ceiba pentandra</i> y <i>Ceiba aesculifolia</i>	75
Figura 18. CCF de las fracciones activas obtenidas del extracto diclorometánico de las cortezas de ceibas.....	76
Figura 19. Vista general en corte transversal de la corteza de <i>Ceiba aesculifolia</i>	80
Figura 20. Vista general en corte transversal de la corteza de <i>Ceiba pentandra</i>	81
Figura 21. Vista general en corte transversal de la corteza de <i>Ceiba sp</i>	83
Figura 22. Cristales presentes en las diferentes cortezas de <i>Ceiba</i>	84

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Pesos de los extractos obtenidos.....	39
Tabla 2. Fraccionamiento del extracto hexánico de <i>Amphipterygium adstringens</i>	42
Tabla 3. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto diclorometánico.....	46
Tabla 4. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del compuesto obtenido del extracto diclorometánico.....	47
Tabla 5. Efecto del EH y FRANA en la sobrevivencia de ratones con daño térmico e infectados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Tabla 6. Datos de herbario de los especímenes colectados.....	55
Tabla 7. Rendimientos obtenidos de las cortezas con solventes orgánicos.....	55
Tabla 8. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto hexánico de <i>Ceiba aesculifolia</i>	60
Tabla 9. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto diclorometánico de <i>Ceiba aesculifolia</i>	61
Tabla 10. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto hexánico de <i>Ceiba pentandra</i>	65
Tabla 11. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto diclorometánico de <i>Ceiba pentandra</i>	66
Tabla 12. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto hexánico de <i>Ceiba</i> sp.....	70
Tabla 13: Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto diclorometánico de <i>Ceiba</i> sp.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características anatómicas de las diferentes especies de <i>Ceiba</i>	82
--	----

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL SISTEMA DE CENSADO QUÓRUM BACTERIANO, DE LAS CORTEZAS DE *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. y *Ceiba* spp.

Naybi Rosario Muñoz Cazares, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013.

La comunicación bacteriana o censado de quórum, es un proceso de expresión de genes a nivel poblacional, dependiente de la densidad bacteriana y mediado por moléculas llamadas autoinductoras, que regula entre otros fenotipos, la expresión de los factores de virulencia. La inhibición del sistema de censado de quórum (I-SCQ), se considera un nuevo blanco, con mecanismo de acción distinto al de los antibióticos. El objetivo de este proyecto, consistió en realizar un estudio biodirigido de la actividad I-SCQ de las cortezas de *Amphipterygium adstringens*, *Ceiba pentandra* y *Ceiba aesculifolia*, empleando el modelo de inhibición de violaceína en *Chromobacterium violaceum*. Los resultados obtenidos, indican la presencia de fracciones activas para las tres cortezas, lográndose identificar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico como uno de los metabolitos activos para el *A. adstringens*. Del mismo modo, el extracto hexánico mostró un efecto positivo en la eliminación de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 y reducción de las lesiones producidas por daño térmico en un modelo con ratones. Los terpenos de las fracciones activas, son distintos entre las dos especies de ceibas, al igual que a nivel histológico presentan características distintivas, las cuales pueden emplearse para hacer estudios de validación para control de calidad. Los resultados obtenidos, justifican el uso tradicional que se les da a estas plantas para combatir infecciones, mediante un mecanismo complementario al antibiótico. Del mismo modo, las ubican como fuentes importantes para la obtención de metabolitos con actividad I-SCQ.

Palabras clave: comunicación bacteriana, censado de quórum bacteriano, *Amphipterygium adstringens*, *Ceiba aesculifolia*, *Ceiba pentandra*, anti-censado de quórum, plantas anti-quórum.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF QUÓRUM SENSING SYSTEM INHIBITION OF BARKS *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. AND *Ceiba* spp.

Naybi Rosario Muñoz Cazares, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013.

Bacterial communication or quórum sensing is a process of gene expression at the population level, bacterial density dependent and mediated by molecules called autoinducer, which regulates among other phenotypes, the expression of virulence factors. Inhibition of quórum sensing system (QSI) is considered a new target, with different mechanism of antibiotic action. The objective project was to conduct bio-guided study of activity the barks *Amphipterygium adstringens*, *Ceiba aesculifolia* and *Ceiba pentandra*, using the system model with the *Chromobacterium violaceum* bacterium. The results obtained indicate the presence of active fractions for three barks, achieving identify 3 α -hidroximasticadienónico acid as one of the active metabolites to the *A. adstringens*. Similarly, the hexanic extract showed a positive effect on the elimination of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and reducing lesions caused by thermal damage in a mouse model. The terpenoids in the active fracciones are distinct in the two ceiba species. As presented histological distinctive features, which can used for validation studies for quality control. The results obtained confirm the traditional use given to these plants to fight infections by a complementary mechanism to the antibiotic effect. Similarly, the important sources placed for obtaining active metabolites QSI.

Palabras clave: bacterial communication, quórum sensing, *Amphipterygium adstringens*, *Ceiba aesculifolia*, *Ceiba pentandra*, anti-quórum sensing, anti-quórum plants.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales en muchas regiones del mundo y sobre todo en México sigue vigente (Argueta, 1994). La gran variedad de climas y condiciones fisiográficas en México permite la presencia de una vegetación muy diversa (Rzedowski, 1978), se ha estimado que la flora fanerogámica de México consta de aproximadamente 22,000 especies (Rzedowski, 1991), lo cual implica un amplio reservorio de plantas medicinales que pueden ser utilizadas por la población (Hersch-Martínez, 1995).

De acuerdo a estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas (OMS, 2002). En nuestro país cerca de 3,350 plantas son de uso medicinal (Bye *et al.*, 1995), sin embargo, se estima que solo al 5% se le ha realizado algún tipo de estudio químico, biomédico y/o farmacológico (Ocegueda *et al.*, 2005).

En la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) está estipulado que para el caso de *medicamentos herbolarios* se tienen que establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deben cumplir las plantas y sus derivados (FEUM, 2001; Gómez-Castellanos, 2009), a pesar de esto la información recabada en las monografías que integran la FEUM son en su mayoría de especies europeas que fueron introducidas al continente americano durante la

conquista, de tal manera que de muchas especies endémicas de nuestro país no se dispone de información científica suficiente para validarlas (FEUM, 2001; Gómez-Castellanos, 2009).

Para estos casos se creó un apartado en la FEUM denominado *Relación de especies de uso etnobotánico*, con el cual se intenta recopilar la información empírica que se tiene hasta el momento y señala algunas especies en la que se debe trabajar para obtener la información científica que sustente su eficacia y seguridad (Gómez-Castellanos, 2009).

Uno de los principales atributos medicinales que se le ha dado a muchas especies vegetales en nuestra medicina tradicional es el relacionado con la actividad antimicrobiana (INI, 1994). La *actividad antimicrobiana* de extractos vegetales procedentes de plantas mexicanas está ampliamente estudiada y documentada (Navarro *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2003; Alanís *et al.*, 2005; Rocha-García *et al.*, 2011). En estos estudios se ha señalado que el efecto antibiótico (bactericida o bacteriostático) es el mecanismo por el cual las especies vegetales eliminan las infecciones bacterianas, sin embargo, en los últimos años se ha empezado a documentar un mecanismo de acción antimicrobiano distinto, que está relacionado con la inhibición de la *comunicación bacteriana*, también llamado *censado del quórum* (CQ).

El CQ actúa mediante la activación y regulación de sistemas de censado del quórum (SCQ) (Reading y Sperandio, 2006; Adonizio, 2008). Los SCQ constan básicamente de dos componentes, el primero es una enzima (o vía metabólica) que inicia la síntesis de pequeñas moléculas difusibles denominadas auto-inductores (AI) y el segundo es un factor de transcripción (sensor/efector) que reconoce y se activa por medio de estas moléculas (Navascués, 2006). Los AI son detectados por el sensor que activa enzimas que inician la expresión de cientos de genes como respuesta a la concentración del AI, la cual está en función de la densidad celular (Waters *et al.*, 2005).

Actualmente, se han reconocido al menos cinco clases de SCQ en procariontes y se han dividido de acuerdo al tipo de molécula AI que utilizan, como son las homoserinlactonas, las quinolonas, los péptidos, los ácidos grasos, así como derivados de la dihidroxipentadiona (Miller y Bassler, 2001; Reading y Sperandio, 2006; Jiménez, 2012).

Cada especie bacteriana puede tener uno a varios SCQ interconectados y activados por una red compleja de regulación y su activación depende completamente de la densidad bacteriana (Miller y Bassler, 2001). Los SCQ en procariontes regulan diversas funciones fisiológicas, pero para el caso de bacterias patógenas está plenamente documentado que la producción de factores de virulencia, toxinas y la formación de biopelículas solo se expresan cuando es activado el SCQ (Rice *et al.*, 2008).

Hasta el momento se han descrito diferentes mecanismos de acción anti-quórum de extractos vegetales o compuestos presentes en ellos, los cuales tienen que ver con su capacidad de interferir en la unión de las moléculas AI's y sus receptores. De igual modo se ha encontrado que algunos pueden disminuir la concentración del AI en el medio, ya sea por su degradación directa o por la inhibición de la sintasa que lo produce (Vattem *et al.*, 2007; Teplitski *et al.*, 2011.).

Una diferencia radical con el mecanismo de acción de los antibióticos, es que este tipo de extractos o moléculas inhibidoras del CQ, no afectan la viabilidad de la bacteria directamente (Adonizio *et al.*, 2006; Vattem *et al.*, 2007; Zahin *et al.*, 2010; Yeo y Tham, 2012), sino que únicamente reducen el daño al evitar la producción de factores de virulencia, ayudando a que el sistema inmune del hospedero se encargue de contrarrestar la infección (Bjarnsholt *et al.*, 2004).

Claramente la capacidad de interferir dentro del proceso de señalización del CQ, representa un nuevo enfoque para el tratamiento de infecciones bacterianas. Tiene la ventaja de que al no haber presión de selección como sucede con los antibióticos, se propone no se adquiere resistencia (Whitehead *et al.*, 2001; Hentzer y Givskov, 2003).

El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos en la actualidad es grave. El uso excesivo e inadecuado de estos, ha causado la aparición de cepas

multi y panresistentes, para las cuales no existen tratamientos adecuados (Blanch, 2010). En México se han implementado nuevas leyes que regulan el uso de los antibióticos, sin embargo, estas acciones no son suficiente para frenar la aparición de estas cepas, lo cual hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas con blancos terapéuticos y tratamientos diferentes. Uno de ellos, puede ser la inhibición del CQ (Hentzer y Givskov, 2003; Adonizio, 2008).

Los estudios sobre fitoquímicos con actividad inhibidora del CQ son escasos y hechos únicamente por grupos extranjeros, analizando plantas utilizadas en la medicina tradicional de países como China, India e Italia. También se investigaron algunos agentes derivados que se consumen comúnmente en la dieta en otras regiones del mundo (Vattem *et al.*, 2007; Quave *et al.*, 2010; Szabo *et al.*, 2010; Zahin *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2011).

Existen varios modelos de sistemas bacterianos que han sido empleados en estos trabajos, los cuales se basan en determinar su inhibición de manera indirecta por medio de la atenuación de fenotipos regulados por uno o varios SCQ. El más común emplea la bacteria *Chromobacterium violaceum*, cuya producción del pigmento violaceína es regulado por un único SCQ, basado en la molécula AI del tipo de las homoserin lactonas (McClellan, 1997; Martinelli *et al.*, 2004). Del mismo modo, se ha utilizado especies bacterianas del género *Vibrio* como es *harveyi* y *fisherii* cuya producción de luz es regulada por uno o dos SCQ (AI del tipo

homoserinlactonas o derivados de la dihidroxipentadiona) (Miller y Bassler, 2001; Reading y Sperandio, 2006).

Para el caso de bacterias patógenas se han empleado varias cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, la cual es una bacteria oportunista que causa graves problemas a nivel hospitalario, debido a su alta capacidad para infectar pacientes inmunosuprimidos, así como de generar resistencia a los antibióticos (Venturi, 2006; Ruíz, 2007; Adonizio, 2008; Jiménez *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* regula la expresión de varios factores de virulencia, en donde destaca la producción de piocianina, pioverdina, rhamnolípidos, y la formación de biopelículas, por medio de tres a cuatro SCQ basados en AI del tipo homoserin lactonas, ácidos grasos y quinolonas (de Kievit., 2009; Jiménez *et al.*, 2012).

En resultados previos obtenidos en nuestro grupo de trabajo, se ha observado la actividad I-SCQ de diversos extractos obtenidos de cortezas de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Los extractos de la corteza de *Amphipterygium adstringens* mostraron una inhibición significativa en la producción de piocianina en *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Así mismo el extracto metanólico de la corteza de “pochote”, obtenida de un comercio de plantas medicinales, la cual fue parcialmente identificada como *Ceiba* sp., resultó ser una de las más activas, al inhibir la producción de violaceína de manera dosis-respuesta (Wang, 2013).

Debido a lo anterior el presente proyecto tuvo como objetivo, hacer un estudio fitoquímico biodirigido de las cortezas de *Amphipterygium adstringens*, *Ceiba pentandra* y *Ceiba aesculifolia*, empleando el modelo de inhibición de violaceína en *Chromobacterium violaceum*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Comunicación bacteriana y sistemas de censado de quórum (SCQ).

El censado de quórum (CQ) es un proceso de comunicación célula-célula bacteriana que involucra la producción, detección y respuesta a moléculas de señalización llamadas autoinductores (AI). Conforme aumenta la densidad celular de la población, el autoinductor se acumula en el medio alcanzando un umbral crítico, al cual las bacterias responden mediante la alteración de su expresión génica a nivel poblacional (Novick y Geisinger 2008; Ng y Bassler 2009; Williams y Cámara 2009).

Los sistemas de censado de quórum (SCQ) se han identificado en diversos microorganismos, y en todos los casos controlan funciones fisiológicas muy diversas como la producción de bioluminiscencia, expresión de factores de virulencia, producción de antibióticos, formación de biopelículas, etc. (Fucqua *et al*, 1994). Cabe señalar que una misma especie bacteriana puede regular los factores de virulencia o alguna otra función mediante la combinación de SCQ, que involucran redes de señalización muy complejas y coordinadas (Waters y Bassler, 2005).

Los SCQ presentan diferencias entre distintos grupos bacterianos, sin embargo, estos sistemas incluyen tres componentes principales: una señal libremente difusible (autoinductor), una sintasa que hace esta señal y un regulador que interactúa con esta señal para regular la expresión de genes (Figura 1) (Adonizio, 2008).

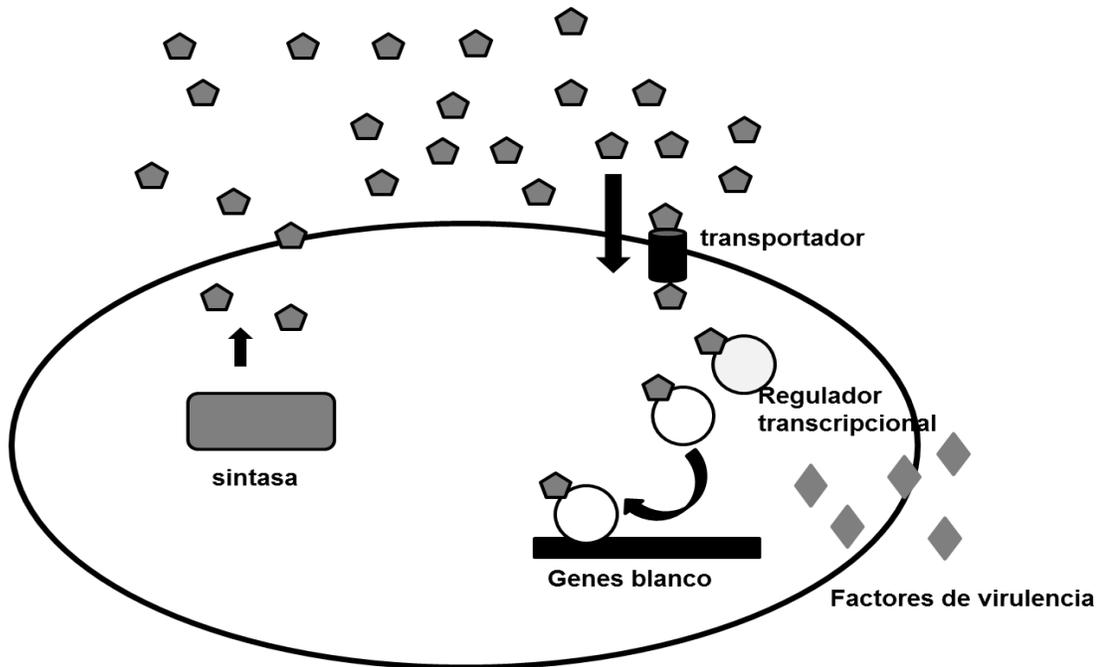


Figura 1. Mecanismo general del funcionamiento del censado de quórum. Tomado y modificado de Wilson *et al.*, 2011.

La naturaleza química de los autoinductores (AI) es específica para cada especie bacteriana, sin embargo, se pueden reconocer aquellos que presentan la estructura química base de N-acil-homoserinlactonas (AHLs), péptidos, derivados de la dihidroxipentadiona (Autoinductor 2, AI-2), quinolonas y ácidos grasos (Figura 2) (Dong y Zhang, 2005; McDougald *et al.*, 2007).

Así mismo, los AI se pueden clasificar en tres subclases: 1) utilizados por las bacterias Gram-negativas; 2) utilizados por las bacterias Gram-positivas, 3) utilizados tanto por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Rutheford y Bassler, 2012).

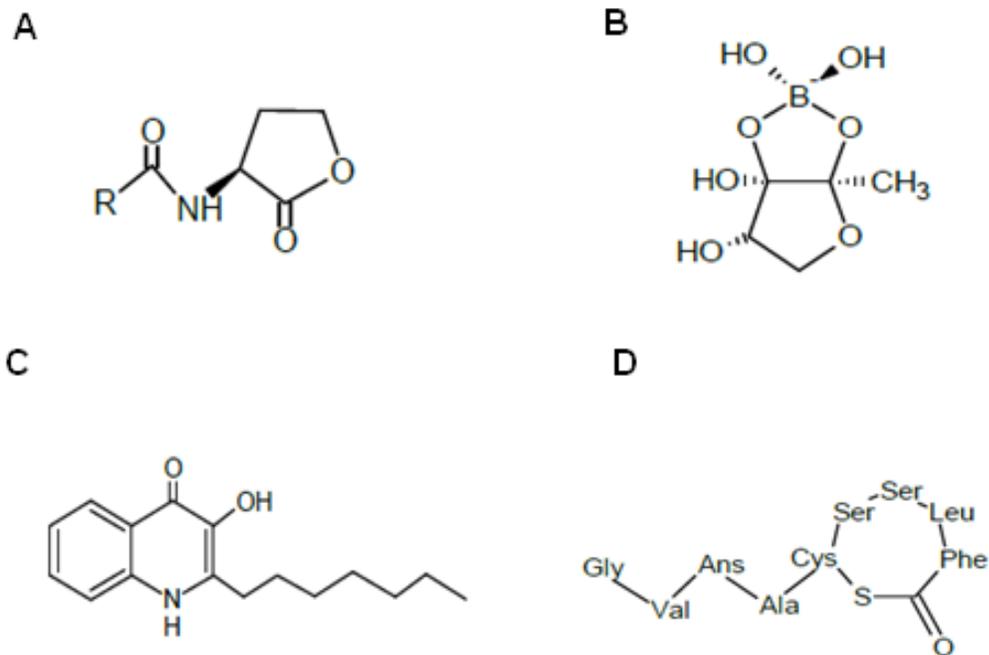


Figura 2. Principales moléculas autoinducoras. A) N-acil-homoserinlactonas (AHLs), B) furanosil borato, C) quinolonas, D) péptidos de bajo peso molecular. Tomado y modificado de Sintim *et al.*, 2010.

Las bacterias Gram-positivas utilizan péptidos, llamados péptidos autoinductores (AIPs), como moléculas de señalización. Cuando los AIP alcanzan una concentración umbral extracelular, lo que ocurre a una alta densidad celular, se unen a un receptor histidina-quinasa presente en la membrana celular. Esta unión induce la actividad del receptor, que se autofosforila y activa la transcripción de genes (figura 3) (Rutherford y Bassler, 2012).

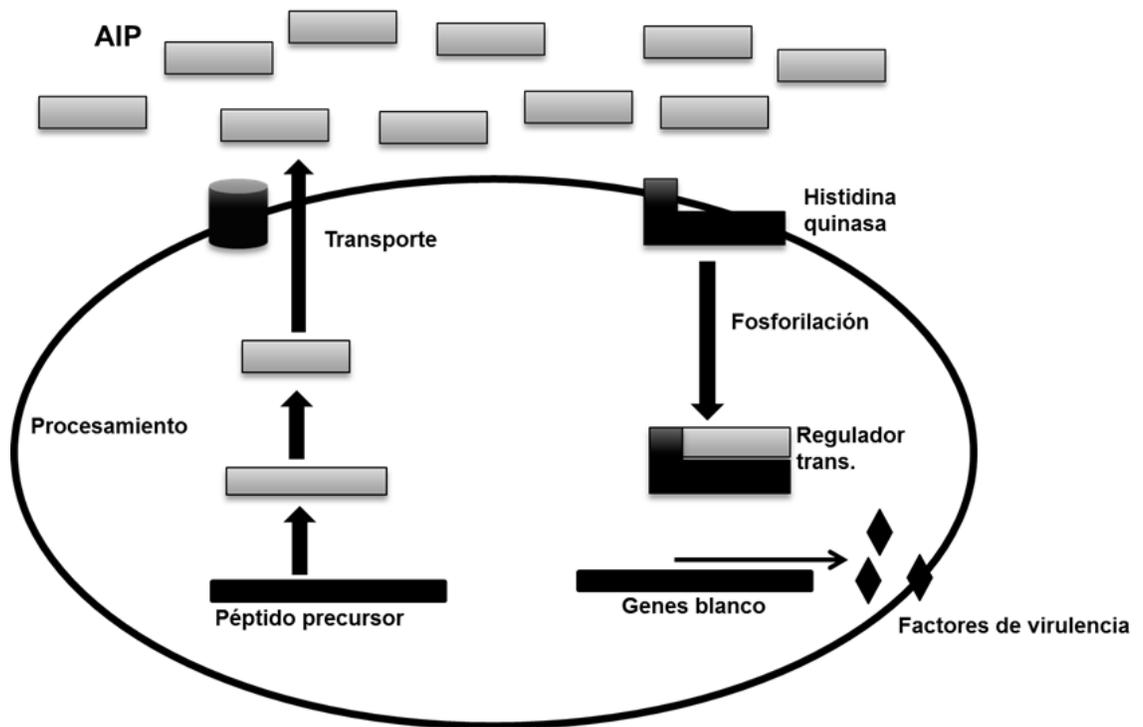


Figura 3. Mecanismo general del funcionamiento del SCQ en bacterias Gram-positivas, en donde AIP= péptidos autoinductores.

Las bacterias Gram-negativas producen N-acil-homoserinlactonas (AHLs) como moléculas autoinductoras, las cuales son sintetizadas por una enzima de tipo *LuxI* (sintasa de la señal) y se pueden difundir libremente a través de la membrana. Cuando su concentración es suficientemente alta, se unen a los receptores (*LuxR*) que son factores de transcripción. La unión del autoinductor con el receptor regula la expresión de los genes (Figura 4) (Nazzaro *et al.*, 2013).

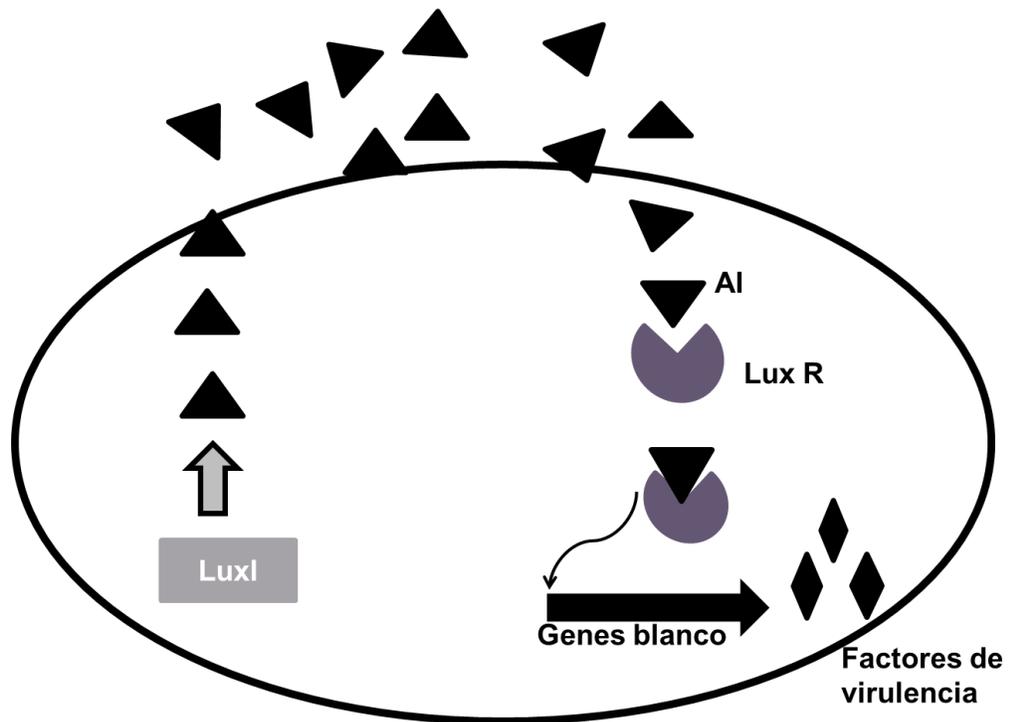


Figura 4. Mecanismo general del funcionamiento del SCQ en bacterias Gram-negativas, en donde LuxI= sintasa de la señal, AI= autoinductor, LuxR= receptor.

El Autoinductor 2 (AI-2) es utilizado por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas para la comunicación intra e interespecie (Bassler, 2002). Este autoinductor es un compuesto de furanosil borato (figura 2) cuyo precursor es la 4,5-dihidroxy-2,3-pentadiona (DPD). El producto DPD, de forma no enzimática se cicla y se convierte en AI-2 en presencia de borato (Miller *et. al.*, 2004; Wilson *et. al.*, 2011; Waters y Bassler, 2005). Las γ -butirolactonas, quinolonas e hidroxicetonas, utilizadas en *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Streptomyces* también son utilizadas en la comunicación intercelular intraespecie (Sintim *et al.*, 2010).

2.2. Productos naturales con actividad I-SCQ.

El reino vegetal es una fuente conocida de principios activos que contribuye ampliamente para el desarrollo de nuevos fármacos (Gao *et al.*, 2003). Igualmente, varias moléculas con actividad inhibidora de sistemas de censado quórum (I-SCQ) se han identificado a partir de plantas. Muchas plantas han coevolucionado y establecido asociaciones simbióticas con bacterias, por lo tanto, no es sorprendente que los organismos superiores son capaces de percibir y responder a estas moléculas (Teplitski *et al.*, 2000; Adonizio *et al.*, 2006; Al Hussaini *et al.*, 2009).

Extractos y moléculas obtenidas de diversos tipos de frutos, hierbas y especias han demostrado tener actividad I-SCQ debido a la similitud en su estructura química con los autoinductores y por su habilidad de degradar la señal de los receptores (Vattem *et al.*, 2007; Brackman *et al.*, 2009; Vikram *et al.*, 2010; Riedel *et al.*, 2006). En México no existen estudios sobre actividad I-SCQ, a pesar de la riqueza florística y cultural de su medicina herbolaria.

Las primeras moléculas I-SCQ que se caracterizaron por primera vez en el alga roja marina *Delisea pulchura*, fueron las furanonas halogenadas que bloquean al autoinductor por medio de la inhibición competitiva y desestabilización del receptor (Manefield *et al.*, 2002). Estas moléculas han mostrado reducir la emisión de luz en especies de *Vibrio* (Givskov *et al.*, 1996), inhiben la producción del pigmento violaceína en *C. violaceum* (Martinelli *et al.*, 2004) y atenúan la producción de exoenzimas y motilidad en *Serratia liquefaciens* (Rasmussen *et al.*, 2000).

Extractos de ajo (*Allium sativum*) inhiben la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* (Rasmussen *et al.*, 2005). Plántulas y exudados radiculares de chícharo (*Pisum sativum*) producen inhibición en la producción de pigmento, actividad exoquitinasa y proteasa en *C. violaceum* (Teplitski *et al.*, 2000).

Varios frutos y especias como fresa, frambuesa, arándano, uva, orégano, tomillo, jengibre y albahaca exhibieron una moderada inhibición en la motilidad de *E. coli* y *P. aeruginosa*, además de inhibir la producción de violaceína en *C. violaceum* (Vattem *et al.*, 2007).

Diferentes aceites esenciales, provenientes de plantas ornamentales y sus componentes, son efectivos en la inhibición de biopelículas en *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus* (Al-Shuneigat *et al.*, 2005; Szabó *et al.*, 2010)

Así mismo, se ha evaluado la actividad I- SCQ de diversas plantas medicinales utilizadas en diferentes partes del mundo. Plantas utilizadas en la medicina tradicional china como son *Prunus armeniaca*, *Prunella vulgaris*, *Nelumbo nucifera*, *Panax notoginseng*, *Punica granatum*, *Areca catechu* e *Imperata cylindrica* mostraron ser activas en la inhibición de la comunicación bacteriana en *C. violaceum* y *P. aeruginosa* (Koh y Tham, 2011).

En el sur de Florida se investigaron 50 especies vegetales de uso medicinal empleando bioensayos con *C. violaceum* y *Agrobacterium tumefaciens*, encontrando únicamente actividad en seis de ellas: *Conocarpus erectus*, *Chamaecybe hypericifolia*, *Callistemon viminalis*, *Bucida burceras*, *Tetrazygia bicolor* y *Quercus virginiana* (Adonizio *et al.*, 2006).

En el caso de plantas medicinales utilizadas en India se evaluaron 24 extractos, empleando también los bioensayos con *C. violaceum* y *P. aeruginosa*, encontrando que *Hemidesmus indicus*, *Holarrhena antidysenterica*, *Mangifera indica*, *Punica granatum* y *Psoralea corylifolia* inhibieron la producción de violaceína y el nado sin afectar la viabilidad de las bacterias (Zahin *et. al.*, 2010).

Plantas como *Ballota nigra*, *Castanea sativa* y *Sambucus ebulus* empleadas como medicinales en Italia, mostraron actividad I-SCQ mediante la disminución en la actividad de una hemolisina producida por *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (Quave *et al.*, 2010).

Cabe señalar, que todos los trabajos anteriores solo se hicieron a nivel de extractos y no se determinó el tipo de metabolitos activos, así como únicamente se determinó la actividad I-SCQ en modelos *in vitro*.

2.3. Moléculas con actividad I-SCQ.

Se ha propuesto que las moléculas I-SCQ deben de tener un bajo peso molecular, con la capacidad de reducir la expresión de genes regulados por SCQ; ser altamente específicas sin efectos adversos en la bacteria o el hospedero, químicamente estables y resistentes a la degradación por los sistemas metabólicos del hospedero (Hentzer y Givskov, 2003; Rasmussen y Givskov, 2006; Vатtem *et al.*, 2007).

Entre las moléculas con actividad I-SCQ se encuentran las furocumarinas, las cuales inhiben la formación de biopelículas en *E. coli* y *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* (Girenavar *et al.*, 2008). El ácido rosmarínico disminuye la expresión de elastasa, proteasa y formación de biopelícula en *P. aeruginosa* (Walker *et al.*, 2004). La curcumina proveniente de *Curcuma longa* inhibe la expresión de factores de virulencia en *P. aeruginosa* (Rudrappa y Bais, 2008).

Compuestos polifenólicos como los ácidos hidroxicinámicos y epicatequinas actúan sinérgicamente contra *C. violaceum* (Fratiani *et al.*, 2011). El ácido gálico, epigalocatequinas, ácido elágico y el ácido tánico bloquean la señal de los autoinductores de AHLs (Riedel *et al.*, 2006; Sarabhai *et al.*, 2013)

El cinamaldehído y sus derivados afectan un amplio rango de factores regulados por el CQ, como la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* e inhiben al AI-2 en diferentes especies de *Vibrio* (Niu *et al.*, 2006; Brakman *et al.*, 2008).

Extractos de vainillina han demostrado tener actividad I-SCQ en *C. violaceum* (Choo *et al.*, 2006).

Flavonoides como naringenina, quercetina, kaempferol y epigenina inhiben la producción de bioluminiscencia en *V. harveyi*. Naringenina reduce la expresión de varios genes regulados por CQ en *P. aeruginosa* PA01 (Vandeputte *et al.*, 2011).

Recientemente nuestro grupo de investigación, reportó la actividad I-SCQ del extracto hexánico y de una mezcla de ácidos anacárdicos aislados de la corteza de *A. adstringens*, los cuales inhiben la producción de violaceína en *C. violaceum*, así como varios factores de virulencia, como son piocinina, ramnolípidos y actividad de elastasa en *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; MX/E/2012/085052).

Otro grupo importante de moléculas I-SCQ, está centrado en el diseño de estructuras química análogas a los autoinductores (homoserinlactonas, quinolonas y derivados de dihidroxipentadiona (autoinductor 2), que son los responsables de activar los SCQ de bacterias patógenas (Waters y Bassler *et al.*, 2005).

Todos los estudios relacionados con moléculas inhibidoras de SCQ bacteriano, provenientes de productos naturales como de derivados sintéticos, se enfocan en estudios *in vitro* y se encuentran en fase preclínica, además de que son muy pocos los que se centran en identificar el sitio de acción, y grado de toxicidad para definir su aplicación (Pan y Ren *et al.*, 2009).

2.4. Mecanismos de inhibición de los sistemas de censado de quórum bacteriano.

El proceso de censado de quórum puede ser interrumpido por diferentes mecanismos: a) inhibición de las enzimas que catalizan la síntesis del autoinductor, b) reducción de la actividad del receptor afín, c) degradación enzimática del autoinductor, d) moléculas que imitan la señal mediante el uso de compuestos sintéticos como análogos de moléculas señal, e) competencia de la unión receptor-signal (Sintim *et al.*, 2010; Kalia, 2013).

Entre las diferentes posibilidades, la degradación enzimática de moléculas señal es la que más se ha aplicado (Kalia y Purohit, 2011). Se ha reportado que tres tipos de enzimas: HSL-lactonasa, HSL-acilasa y HSL-oxidasa, actúan sobre moléculas autoinductoras AHLs y son producida por bacterias como *Bacillus* y *Streptomyces* (Park *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2010; Chowdhary *et al.*, 2007). El ácido γ -aminobutírico (GABA) que producen diferentes plantas, actúan como promotores de la enzima lactonasa para la degradación del autoinductor HSL (Chevrot *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002).

En el caso de la degradación de la enzima sintasa, el antranilato y el ácido betacetónico actúan como análogos de autoinductores (Calfee *et al.*, 2001), la furanona 5z-4-bromo-5 bromometilen-3-butyl-2(5H)-furanona inhibe la sintasa del AI-2 de *V. harveyi* (Pan y Ren, 2009).

La mayoría de las furanonas producidas por el alga marina *Delisea pulchra*, actúan por competencia de la unión receptor-señal, al igual que el cinamaldehído, la hamamelitanina y algunos flavonoides provenientes de diferentes especies vegetales (Vattem *et al.*, 2007; Kalia, 2013).

Los anticuerpos y los receptores señuelo para inhibir las señales de QS se han sugerido como nuevos enfoques para la terapia anti-infecciosa (Dembitsky *et al.*, 2011; Kaufmann *et al.*, 2006).

2.5. *Chromobacterium violaceum* y la producción de violaceína.

C. violaceum es una bacteria Gram-negativa, facultativa anaerobia de hábito saprofito, que se encuentra en suelos y agua de áreas tropicales y subtropicales de varios continentes. Ocasionalmente puede actuar como patógeno oportunista en animales y humanos causando septicemia derivada de lesiones en la piel y abscesos en pulmones e hígado (Richards, 1993; Midani y Rathore, 1998).

Produce una serie de características fenotípicas que incluyen la producción de violaceína, antibióticos, cianuro de hidrógeno, y exoproteasas que son reguladas por SCQ, específicamente por el autoinductores derivados de acilhomoserin- lactonas (AHLs) (Cha *et al.*, 1998).

La producción de pigmento en esta bacteria está totalmente regulada por el censado de quórum, exclusivamente por el sistema Cvi/R AHL, que produce y responde a homoserinlactonas (AHLs) específicas. Unas cepas silvestres y una mutante derivada de ellas (CV026), la cual no es capaz de producir su propia señal AHLs, sino que responde a moléculas adicionadas exógenamente, han probado ser biosensores sensibles y eficaces en la búsqueda de moléculas I-SCQ (McClellan *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 1998).

2.6. Descripción botánica y antecedentes de las especies estudiadas.

2.6.1. *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.

2.6.1.1. Taxonomía

Amphipterygium adstringens es un árbol de la familia Anacardiaceae que se conoce comúnmente como cuachalalate, cuachalala, matixeran, pacueco, palo santo y cuachinala (Argueta y Cano, 1994; Cuevas, 2004).

2.6.1.2. Descripción

A. adstringens es un árbol dioico, que mide entre 5 y 10 m de altura. Las hojas están dispuestas en espiral y aglomeradas en las puntas de las ramas en grupos de tres a cinco miden aproximadamente 3-6 cm incluyendo el pecíolo.

La corteza externa es lisa con grandes escamas engrosadas y suberificadas de color gris a gris plomiza con numerosas lenticelas protuberantes, redondas y pálidas. La corteza interna de color crema rosado a rosado, fibrosa, con un exudado blanco cremoso, extremadamente astringente y de olor picante. El grosor total de la corteza es de 30 a 20 mm, sin incluir las escamas (Pennington y Sarukhán, 2005).

El fruto consiste en nueces abultadas de color verde pálido, sobre los pedicelos aplanados hasta formar una especie de ala, contiene 1 o 2 semillas muy aplanadas de 5 mm de largo (FEUM, 2001; Cuevas, 2004)

2.6.1.3. Hábitat y distribución

La especie habita en regiones de clima cálido, semicálido y templado desde los 100 a 3 000 m y es una especie común en el bosque tropical caducifolio (Argueta y Cano, 1994).

Es una especie nativa de México restringida a la vertiente del Pacífico desde Nayarit, sureste de Zacatecas y norte de Jalisco hasta Oaxaca, Guatemala y Costa Rica incluyendo la cuenca del río Balsas, (Niembro, 1990; Pennington y Sarukhán, 2005)

2.6.1.4. Usos y actividad biológica

Se han descrito 44 usos medicinales, y es una de las plantas medicinales que más se comercializan en la zona suroccidente de Puebla y en el Distrito Federal (Hersh-Martínez, 1995). La corteza es la parte mayormente utilizada (Olivera, 1998), Ocupa el octavo lugar en importancia, de cuatrocientas especies útiles registradas en el uso tradicional en el estado de Morelos (Boyás *et al.*, 1988) y su aprovechamiento se concentra principalmente en los estados de Morelos y Guerrero (Solares *et al.*, 2006).

Diversos estudios han demostrado que los extractos y compuestos obtenidos de ésta corteza tienen capacidad antiinflamatoria, antiulcerogástrica, citotóxica, antifúngica y antimicrobiana (Navarrete *et al.*, 1998; Olivera, 1998; Bravo *et al.*, 2000; Oviedo-Chavez *et al.*, 2004; Rivero-Cruz *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007). El efecto terapéutico se atribuye a la presencia de dos tipos de compuestos mayoritarios: los triterpenoides y los fenoles de cadena larga (Olivera, 1998; Rosas, 2005; Navarrete *et al.*, 2006).

Los triterpenoides mayoritarios en la corteza son los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y el masticadienónico. Entre los compuestos fenólicos están los ácidos anacárdicos, también se han aislado β -sitosterol y aldehídos fenólicos (Argueta *et al.*, 1994; Navarrete *et al.*, 1989; Olivera, 1998).

2.6.2. *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn.

2.6.2.1. Taxonomía

La ceiba es un parbol que se le conoce comúnmente como pochota, pochote y puchute (Pennington y Sarukhán, 2005). Pertenece a la familia Mlavaceae y la subfamilia Bombacoideae.

2.6.2.2. Descripción

Se trata de un árbol monopódico de hasta 40 m. El tronco presenta contrafuertes grandes y bien desarrollados, y está cubierto por numerosas espinas cónicas.

La corteza externa es lisa a ligeramente fisurada en ocasiones, gris plumiza a verdosa, cubierta de espinas cónicas, sobre todo en los individuos jóvenes, tiene lenticelas protuberantes suberificadas y pálidas. La corteza interna es de color crema amarillento, granulosa y presenta abundantes fibras. El grosor total es de 18 mm (Pennington y Sarukhán, 2005).

Las hojas son ovadas de margen entero, palmaticompuestas de 11 a 40 cm de largo, incluyendo el pecíolo, compuestas de 7 a 8 folíolos, de 5 x 1.5 a 15 x 4 cm. Las flores son numerosas dispuestas en fascículos de color blancuzco a rosado, amarillo o dorado. El fruto es una cápsula oblonga o elíptica, de color pardo. Contienen numerosas semillas negras, rodeadas por abundante vello sedoso blanco a gris plateado (Vázquez-Yanes *et al.* 1999).

2.6.2.3. Hábitat y distribución

Es una especie de amplia distribución geográfica originaria de América Central. En la vertiente del Golfo se distribuye desde el sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán y en la vertiente del Pacífico, desde Sonora hasta Chiapas. Se extiende desde el sur de México hasta Venezuela, Brasil y Ecuador. También se encuentra en los trópicos del Viejo Mundo (regiones tropicales de África Occidental y Asia). Se ha introducido a los archipiélagos de las Bermudas y Bahamas (Vázquez-Yanes *et al.* 1999).

2.6.2.4. Usos y actividad biológica

La fibra algodonosa que rodea las semillas conocida como kapok, es utilizada como materia prima para fabricar colchones, almohadas y cojines.

Se reporta que varias partes de este árbol son usadas como remedios contra la diabetes, hipertensión, dolor de cabeza, mareos, constipación, úlcera péptica, reumatismo y como diúretica (Noumi *et al.* 1999; Ngounou *et al.*, 2000). También es utilizada para curar quemaduras y salpullido (Vázquez-Yanes *et al.* 1999). Sin embargo los estudio fitoquímicos son escasos y la mayoría son solo a nivel de extracto y no de moléculas puras.

2.6.3. *Ceiba aesculifolia* (Kunth) Britten & Baker f.

2.6.3.1. Taxonomía

Este árbol pertenece a la misma familia que la especie anterior, la Malvaceae e igualmente se le conoce comúnmente como pochote, pochotle, ceiba, pochote de secas (Reyes *et al.*, 2004; Canales *et al.*, 2005; Avendaño *et al.*, 2006).

2.6.3.2. Descripción

Es un árbol deciduo de hasta 15 m de altura; el tallo como las ramas presentan espinas cónicas (Guízar y Sánchez, 1991). La corteza externa es de color gris a gris plomizo, lisa a fisurada, con líneas longitudinales, a veces con lenticelas conspicuas. La corteza interna es rosada a rojiza, con grandes expansiones de parénquima. El grosor total de la corteza es de 5 a 20 mm (Pennington y Sarukhán, 2005).

Las hojas son palmaticompuestas con 5 folíolos, con el margen dentado a aserrado, dispuestas en espiral. Las flores son solitarias de color amarillo o dorado, y densamente aterciopelados. El fruto es una cápsula ovada con numerosas semillas rodeadas de abundante vello sedoso (Guízar y Sánchez, 1991).

2.6.3.3. Hábitat y distribución

Se distribuye en el bosque tropical caducifolio y encinar en los estados de Guerrero, Morelos, Puebla, Oaxaca, Tabasco y Yucatán (Pagaza y Fernández, 2004).

2.6.3.4. Usos y actividad biológica

La corteza de *Ceiba aesculifolia* es utilizada para curar trastornos renales e infecciones de la piel, así como para disminuir los niveles de azúcar en la sangre (Avendaño et al., 2006), además de presentar actividad antimicrobiana (Canales et al., 2005; Orozco, 2010). Las semillas también se utilizan para tratamiento contra la gastritis (Avendaño et al., 2006). Sin embargo los estudios químicos y farmacológicos son muy pocos. Se reporta la presencia de fenoles, terpenos, fenilpropanoides, una isoflavona y una cumarina (Orozco, 2010).

La actividad antibacterial, antidiabética y antiinflamatoria de *C. aesculifolia*, es similar a la reportada para *C. pentandra* (Ladeji et al., 2003; Mohan et al., 2013), no hay reportes relacionados con la actividad I-SCQ.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Hacer un estudio fitoquímico de las cortezas de *Amphipterygium adstringens*, *Ceiba aesculifolia* y *Ceiba pentandra*, para identificar metabolitos con actividad inhibidora del sistemas de censado de quórum bacteriano, mediante diversos métodos fitoquímicos y ensayos biodirigidos que emplean el sistema modelo de *Chromobacterium violaceum*.

3.2. Objetivos particulares

- Análisis fitoquímico de los extractos de las cortezas de *Amphipterygium adstringens*, *Ceiba aesculifolia* y *Ceiba pentandra* mediante técnicas cromatográficas convencionales.
- Diseño y montaje del método para determinar la actividad inhibidora de sistemas de censado quórum bacteriano, basado en la producción de violaceína por *Chromobactreium violaceum*.
- Evaluación de la actividad inhibidora del SCQ de las fracciones y compuestos aislados en la producción de violaceína de *C. violaceum*.
- Purificación y caracterización química de compuestos activos por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención del material biológico

El material biológico de *Amphipterygium adstringens*, y *Ceiba* sp. se obtuvo de un centro de distribución de plantas medicinales de la Ciudad de México “Proveedor De Yervas y Especies S.A de C.V.” sucursal 1016. Anillo de Circunvalación 1016 C.P. 15810. México, D.F. Para trabajar con una muestra caracterizada, se decidió coleccionar e identificar dos de las principales especies del género *Ceiba* que se distribuyen en la zona centro del país. Las muestras de *C. aesculifolia* se recolectaron en el ejido la Serenilla Tierra Blanca, Veracruz, México; en las coordenadas 18° 34.189'N y 096°22.690'W. Para *C. pentandra* las muestras se obtuvieron en el estado de Oaxaca, municipio de Acatlán en las coordenadas 18° 32.677'N Y 096°36.336'W.

Las cortezas se colocaron en bolsas de plástico para su transporte a laboratorio, en donde se sometieron a un proceso de desecación en una estufa a 60°C por 48 horas. Posteriormente fueron pulverizadas en un molino eléctrico. Se coleccionaron también ejemplares para herbario, los cuales fueron depositados en el Herbario de la Universidad Autónoma Chapingo (CHAP), para su identificación y número de registro.

4.2. Obtención de los extractos

Un kilogramo de cada una de las cortezas se sometió a un proceso de extracción consecutiva por maceración con 2.5 L de disolvente orgánico a temperatura ambiente, por periodos de 48 horas durante 15 días. Se inició con hexano (J.T. Baker) seguido de la extracción con diclorometano (J. T. Baker) y metanol (J.T. Baker).

Se eliminaron los disolventes empleando un rotavapor R-114 (Buchi) y posteriormente se determinó el rendimiento.

4.3. Métodos de separación.

Después de obtener los extractos crudos se separaron los componentes mediante de cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía por adsorción en columna abierta y al vacío utilizó silicagel 60 Merck, con tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, malla de 70-230 ASTM. Los análisis de cromatografía de CCF se hicieron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con silica gel (TLC Silicagel 60 F₂₅₄ Merck), de 0.25 mm de espesor con soporte de aluminio de 20 x 20. Las placas se visualizaron bajo la luz ultravioleta (onda corta, 254 nm y onda larga, 360 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina 2% y H₂SO₄ 10% en etanol, seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa de los compuestos.

4.4. Fraccionamiento de los extractos.

4.4.1. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de *Amphipterygium adstringens*

Columna 1: El extracto hexánico de *A. adstringens* se sometió a un proceso de CC abierta 73 x 6.5cm, empacada con 298.8 g de gel de sílice. Se eluyó utilizando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-cloroformo, hexano-diclorometano, y acetato de etilo en diversas proporciones (tabla 2).

Columna 2: El extracto diclorometánico de *A. adstringens* se sometió a un proceso de CC al vacío 73 x 6.5 cm, empacada con 100 g de gel de sílice. Se eluyó utilizando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo diversas proporciones (tabla 3).

Todas las fracciones obtenidas de las columnas se monitorearon por CCF.

4.4.1.1 Purificación e identificación del compuesto aislado del extracto diclorometánico.

Los compuestos separados por las técnicas de cromatografía se purificaron mediante las técnicas de cristalización y recristalización. Se identificaron a través de comparación con muestras estándares en CCF y resonancia magnética nuclear H^+ (RMN¹H).

Los estudios espectroscópicos se llevaron a cabo en el Instituto de Química de la UNAM, con las facilidades otorgadas por el laboratorio del Dr. Mariano Martínez. El espectro de resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹H, 400 MHz), se generaron en un equipo Bruker Avance III utilizando CDCl₃, los desplazamientos químicos se reportan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS). Quedó registro en la base de datos con la clave 1301-H13.

4.4.2. Fraccionamiento de los extractos de las muestras de ceibas.

Las diferentes cortezas de *Ceiba* spp. fueron sometidas a CC al vacío en diferentes sistemas de elución.

4.4.2.1. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba aesculifolia*

Columna 3 y 4: Los extractos hexánico y diclorometánico de *C. aesculifolia* se sometieron a un proceso de CC al vacío 34 x 6.5 cm, empacada con 200 g de gel de sílice. Las columnas se eluyeron utilizando como fase móvil hexano y mezclas de hexano-acetato de etilo diversas proporciones (Tabla 10 y 11).

4.4.2.2. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba pentandra*

Columna 5 y 6: El extracto hexánico de *C. pentandra* se sometieron a un proceso de CC al vacío 34 x 6.5 cm, empacada con 131 g de gel de sílice. La columnas se eluyeron utilizando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo diversas proporciones (Tabla 12 y 13).

4.4.2.3. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba* sp.

Columna 7 y 8: El extracto hexánico y diclorometánico de la corteza de *Ceiba* sp., obtenida de la tienda de plantas medicinales, se sometieron a un proceso CC al vacío 34 x 6.5 cm, empacada con 160 g de gel de sílice. Las columnas se eluyeron

utilizando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo diversas proporciones (Tabla 14 y 15).

4.5. Evaluación de la actividad I-SCQ bacteriana de las fracciones, empleando en sistema de *Chromobacterium violaceum*.

Para evaluar la actividad I-SCQ se empleó el método de ensayos biodirigidos reportado por Taganna *et al.*, 2011, monitoreando la atenuación de un fenotipo controlado por el sistema de censado de quórum, que es la producción de violaceína en la bacteria *C. violaceum*.

En este método se emplea la cepa mutante CV026, la cual tiene una mutación que evita que se sintetice el autoinductor, y no produce pigmento que interfiera con las mediciones en el espectrofotómetro. Cabe señalar, que la mutación en la cepa CV026, no afecta la capacidad para que pueda censar al autoinductor, por lo que se puede activar la producción de violaceína si se agrega exógenamente.

4.5.1. Cepas bacterianas

Se utilizaron dos cepas de *C. violaceum*, una silvestre (wild type) y una mutante denominada CV026 (una mini-Tn5 mutante), ambas obtenidas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, por medio de la Dra. Graciela Castro Escarpulli.

4.5.2. Condiciones de cultivo

Para ambos ensayos, las cepas se cultivaron de forma rutinaria en medio LB (Luria-Bertani). Para iniciar el bioensayo se preparó un preinóculo, colocando una colonia de cada cepa en diferentes tubos con 5 mL de medio LB por separado y se dejaron incubar por 20 hrs a 25°C y 150 rpm. Posteriormente se diluyeron los cultivos en 50 mL de medio LB y se ajustaron a una absorbencia de 0.1 D.O_{660 nm} (10^5 UFC/mL).

4.5.3. Determinación del crecimiento

Se agregaron 200 µL de cultivo de la cepa mutante CV026 a cada pozo, empleando placas de 96 (Nuclon Surface; NUNC estériles con tapa). Los extractos y fracciones se solubilizaron previamente en DMSO (grado HPLC, MERCK) y se ajustó a una solución stock de 8 mg/ml. Se añadieron 5 µL por cada pozo, quedando en una concentración final de 200 µg/ml. Para el caso de los controles negativos se agregó 5 µl de DMSO, así como medio LB únicamente. Como control positivo, se utilizó una mezcla de ácidos anacárdicos aislados de la corteza de *A. adstringens* previamente caracterizada, a una concentración de 100 µg/mL. Las placas fueron incubadas por 48 hrs a una temperatura de 27 °C y 150 rpm.

Después de la incubación se midió la absorbencia a D.O._{660nm} de los cultivos empleando un espectrofotómetro (multiskan spectrum; Thermo Scientific). Se determinó el porcentaje de crecimiento tomando como el 100% los valores de los

controles negativos (LB y DMSO). Para contrarrestar la absorbencia natural de algunos extractos y fracciones, se hicieron dos mediciones iniciales, una de la placa con los cultivos y otra con las fracciones y/o extractos incorporados. En los casos donde había absorbencia por parte de las muestras a determinar, al momento de calcular el crecimiento o producción de violaceína se les restó dicho valor.

4.5.4. Determinación de la producción de violaceína

En otra placa de 96 pozos se agregaron 200 μ l de cultivo de la cepa silvestre (WT), se utilizaron los mismos extractos, fracciones, controles y medidas que en el caso de la determinación del crecimiento.

Transcurrido el tiempo de incubación, la placa se puso en una estufa (Felisa) a 60°C hasta que todo el medio se evaporó (aproximadamente 24 horas), la violaceína de cada pozo se resolubilizó con 200 μ L de DMSO y se puso en agitación (200 rpm) durante 2 horas. Posteriormente se midió la concentración del pigmento a D.O._{590nm} y se obtuvo el porcentaje de producción, tomando los valores de los controles positivos como el 100%.

4.6. Modelo de infección de *Pseudomonas aeruginosa* en lesiones producidas por daño térmico.

Esta parte del proyecto se llevó a cabo en el bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con las facilidades otorgadas por el laboratorio de la Dra.

Norma Velázquez Guadarrama. El protocolo fue previamente aprobado por el comité de ética del mismo Hospital.

4.6.1. Inóculo bacteriano.

Para el ensayo se preparó un preinoculo, resuspendiendo una colonia de *P. aeruginosa* PA14 con seis días de crecimiento, en 10 mL de medio LB y se incubó por 12 hrs, 30°C a 190 rpm. Posteriormente se tomó 1 mL del preinoculo y se homogenizó en 90 mL de medio LB. Se dejó crecer a 37°C por una hora a 120 rpm y se ajustó a una D.O.₅₄₀ de 0.5. Transcurrido el tiempo, se tomó 1 mL y centrifugó a 13 K por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, posteriormente se realizaron varios lavados con PBS estéril a la pastilla bacteriana, la cual se homogenizó en 1 mL de PBS estéril y se realizaron diluciones 1/10, hasta 1×10^{-4} , que es la dilución con 10^4 UFC.

4.6.2. Inducción de daño térmico e infección con *Pseudomonas aeruginosa*.

Se emplearon ratones BalbC de 8 a 10 semanas de edad (17 a 20 g), los cuales se anestesiaron intraperitonealmente con 0.35 mL por cada 20 gr de peso de una solución de pentobarbital sódico (2.06 mg/mL). Se rasuró la parte dorsal de los animales, la cual fue colocada sobre una placa metálica con una abertura de 0.8 x 1.8 cm. La parte expuesta es de alrededor del 15% del área de la superficie total de los animales.

Para inducir el daño térmico en los ratones, se expuso la parte dorsal en agua a 90°C por 10 segundos. El daño provocado no fue letal, pero si produjo quemaduras de tercer grado. Inmediatamente después, se administró una terapia de reemplazamiento de fluidos, que consistió en una inyección subcutánea de 0.1 mL de solución Hartman o lactato de sodio estéril. Se proporcionó un tiempo de reposo 5 a 10 minutos y posteriormente se inoculó la herida con 0.1 mL de una solución con 10^4 UFC (dilución del inóculo bacteriano 1×10^{-4}) de la cepa de *P. aeruginosa* PA14.

4.6.3. Tratamientos.

Después de la inoculación, los animales fueron administrados tópicamente con 0.2 mL cada 12 hrs de los distintos tratamientos por 12 días. Los tratamientos utilizados fueron: extracto hexánico de la corteza de *A. adstringens* (muestra de referencia) a 55.3 y 166 mg/mL (EH), una fracción rica en ácidos anacárdicos (obtenidos previamente por el grupo de trabajo, de la muestra de referencia) de la corteza de *A. adstringens* a 500 mg/mL (FRANA) los cuales fueron previamente diluidos en aceite de canola estéril. Como control negativo se utilizó aceite de canola estéril.

4.6.4. Identificación y cuantificación de *Pseudomonas aeruginosa* en las lesiones.

Se monitoreó la evolución de las lesiones y el estado general de los animales, así como la sobrevivencia cada 24 hrs. Al doceavo día de

experimentación, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Las lesiones fueron retiradas y homogenizadas en 1 mL de PBS estéril. Posteriormente se hizo una cuenta viable haciendo diluciones 1/10 (10 ml de la muestra con 90 ml de LB), hasta 1×10^{-7} y se sembró 10 ml en placas de medio LB con cuatro divisiones. Se dejaron incubar por 72 hrs a 37°C.

Se identificó la bacteria mediante tinción de Gram y por el viraje de las colonias a color verde que se da después de 72 hrs, debido a la producción de los pigmentos piocianina y pioverdina.

4.7. Estudio anatómico de las cortezas de *Ceiba* spp.

Se estudió la anatomía de las cortezas del género *Ceiba*, ya que la de la corteza de *A. adstringens* ya era conocida (Navarrete *et al.*, 2006; Rosas-Acevedo *et al.*, 2011)

Pequeños trozos de corteza (interna y externa) de cuatro individuos de *C. aesculifolia* y *C. pentandra* se obtuvieron a una altura de 1.30 m del tronco principal. Posteriormente se incorporaron a una solución de glicerina-alcohol etílico-agua (GAA, 1:2:3) durante un período de 30 días para ablandarlas. Esta solución permite conservar contenidos celulares (Aguilar-Rodríguez y Castro-Plata, 2006).

4.7.1. Microtécnica

Se hicieron cortes de 20-30 μm de grosor en los planos transversal, tangencial y radial empleando un micrótopo de deslizamiento. En el caso del plano tangencial se hicieron cortes seriados de la corteza al cambium vascular. Los cortes se tiñeron con safranina y verde rápido para ser montados en resina sintética (Johansen, 1940).

La descripción anatómica de las cortezas de *Ceiba* siguió las recomendaciones de Trockenbrodt (1990). Las mediciones del diámetro tangencial de los elementos de tubo criboso y las imágenes se obtuvieron empleando el analizador NIS-elements BR 2.33 (Nikon Corporation 1991-2006). Los dibujos generales de la corteza se elaboraron empleando una cámara clara a 1X en un microscopio marca Nikon Labophot-2.

4.8. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Para obtener los valores de significancia entre dos condiciones, se empleó la prueba t-student de dos colas, para muestras independientes.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de los extractos e identificación de la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

De la corteza seca y molida de la muestra obtenida del comercio, se hicieron extracciones consecutivas con hexano, diclorometano y metanol. Los rendimientos de los extractos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Pesos de los extractos obtenidos

Extracto	Peso (g)
Hexánico	16
Diclorometánico	49.8
Metanólico	124

A partir de 1 kg de peso seco

La apariencia física que presentaron los extractos hexánico y diclorometánico fueron residuos oleosos de color verde oscuro, mientras que el metanólico tiene fue un sólido de color café-rojizo.

Se identificó la corteza obtenida del comercio mediante la comparación en CCF de los principales metabolitos descritos para la planta en la literatura, como son los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico (Figura 5) (FEUM, 2001; Navarrete, 1986; Olivera-Ortega et al., 1999; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

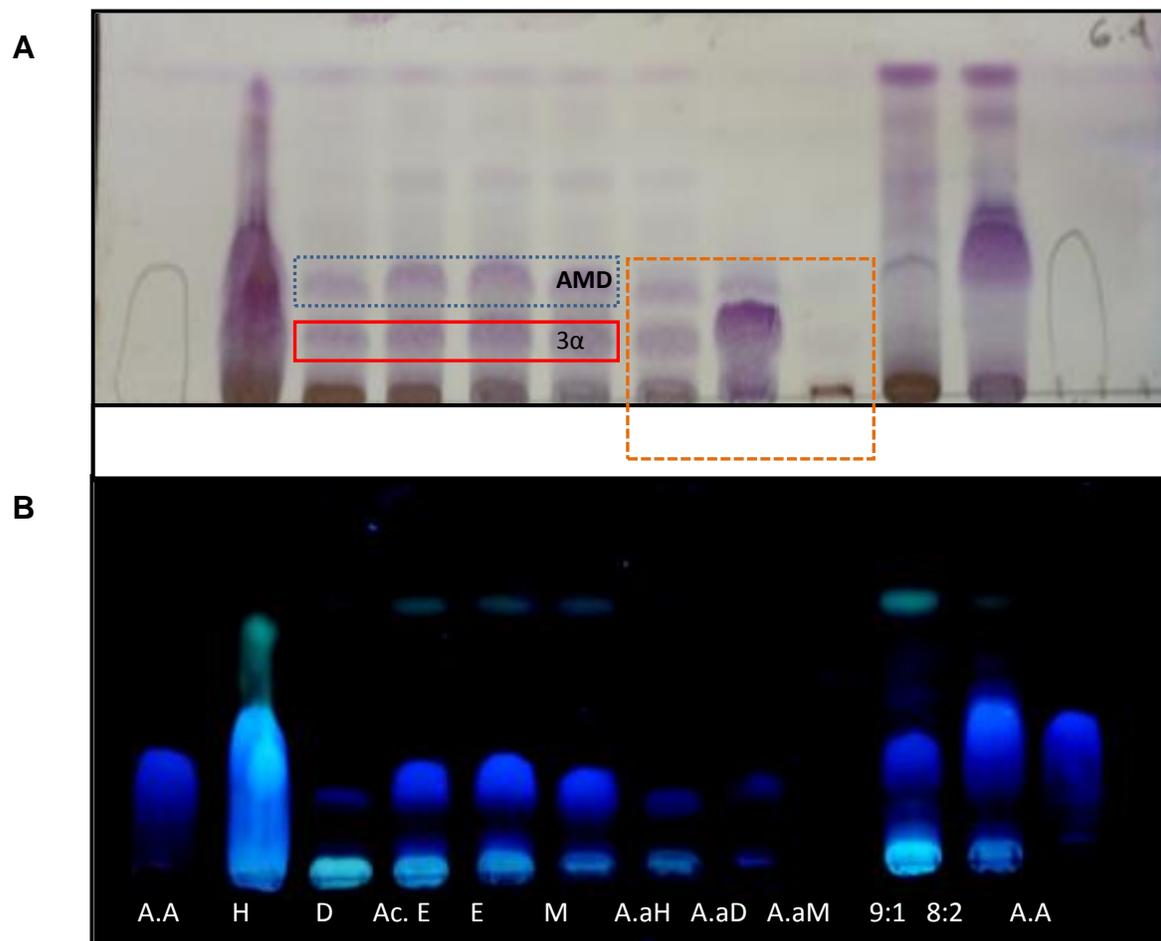


Figura 5. CCF de los extractos de la corteza de *Amphipterygium adstringens* de referencia y la proveniente del comercio de plantas medicinales. A) Placa revelada con vainillina-ácido sulfúrico 10%, B) Placa sin revelar e iluminada con luz UV a 254 nm. Extracciones de la muestra de referencia con hexano (H), diclorometano (D), acetato de etilo (Ac. E.), etanol (E), metanol (M), extractos obtenidos de la muestra del comercio, hexano (A.aH), diclorometano (A.a.D), metanol (A.aM). Estándar de ácidos anacárdicos (A.A) (MERCK 172050-10MG). Ácido masticadienónico (AMD) y 3 α -hidroximasticadienónico (3 α). Las placas se eluyeron en un sistema 6:4 (Hexano: Acetato de Etilo).

La muestra obtenida del comercio de plantas medicinales contiene los dos triterpenos mayoritarios descritos para esta corteza: el ácido masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico (Olivera et al, 1999; FEUM, 2001; Oviedo-Chávez et al., 2004) principalmente en los extractos hexánico y diclorometánico, como se aprecia en la figura 5. En el extracto metanólico no se detectaron estas moléculas bajo las condiciones experimentales (Figura 5A).

Comparado con la muestra de referencia, se observa una mayor abundancia de triterpenos y otros metabolitos con respecto a la MOCD, razón por la cual en el carril, cargado con el extracto hexánico no se resuelven por completo (Figura 5A). La presencia de ácidos anacárdicos, se observó en los extractos hexánico y diclorometánico de la MOCD, siendo más abundantes en los extractos de la de referencia (Figura 5B).

5.1.1. Fraccionamiento del extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* y su actividad I-SCQ.

Se separaron 16 g de extracto hexánico por CC empleando un gradiente de elución de hexano: diclorometano y hexano: acetato de etilo, evaluando la actividad I-SCQ mediante la inhibición de la producción de violaceína de *C. violaceum*. Se obtuvieron un total de 145 fracciones, las cuales fueron reagrupadas en 18 finales tomando en consideración el patrón cromatográfico en CCF (tabla 2).

Tabla 2. Fraccionamiento del extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens*

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave (mg)
Hexano	1:0	1-40	1-15 16-26 27-38 38-55	*F-1H (30.3) F-2H (.4) F-3H (9) F-4H (7.1)
Hexano:Cloroformo	9.5:.5	41-55		
Hexano:Cloroformo	9:1	56-75	56-75	F-5H (6.6)
Hexano-Diclorometano	8:2	76-94	76-77 78-84 90-94	F-6H (1.9) *F-7H (96.7) *F-8H (25.9)
Hexano-Diclorometano	7:3	95-96	94-96	*F-9H (108.3)
Hexano-Diclorometano	6:4	97	97-98	*F-10H (278.4)
Hexano-Diclorometano	5:5	98-125	99-100 101-104 105-111 112-121 122-125	*F-11H (557.6) *F-12H (135.8) *F-13H (210) *F-14H (210) *F-15H (140)
Diclorometano-Hexano	6:4	126-132		*F-16H (40)
Diclorometano-Hexano	7:3	133-134	126-134	
Diclorometano	1:0	135-145	135-145	*F-17H (50)
AcOEt	1:0	146-155	146-155	*F-18H (50)

*Fracciones que se emplearon en los ensayos biológicos. Donde: AcOEt: acetato de etilo

En la figura 6 se muestra la diversidad de metabolitos presentes en las 18 fracciones obtenidas mediante el análisis en CCF. La presencia de dobles ligaduras a UV 254 nm puede ser indicador de la presencia de anillos bencénicos en algunas fracciones (Figura 6B). También se puede observar la abundancia de metabolitos de naturaleza terpénica, debido a que varias fracciones tomaron una coloración azul y magenta con el agente cromógeno vainillina-ácido sulfúrico (Figura 6A).

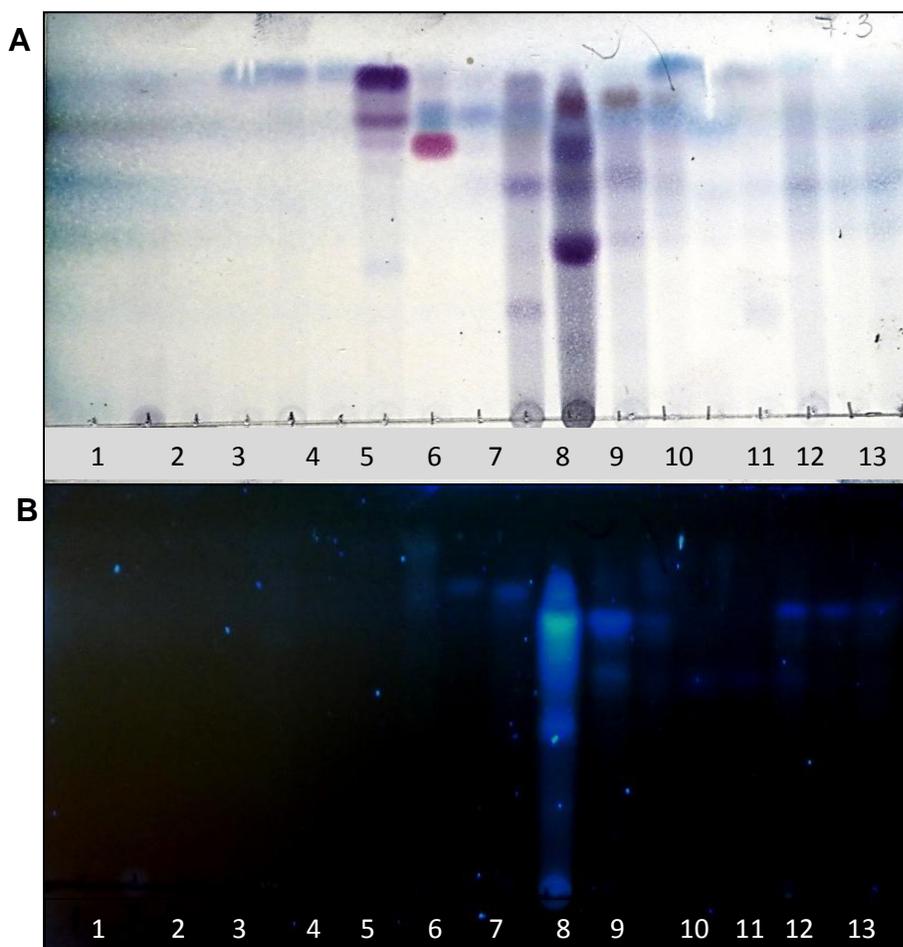


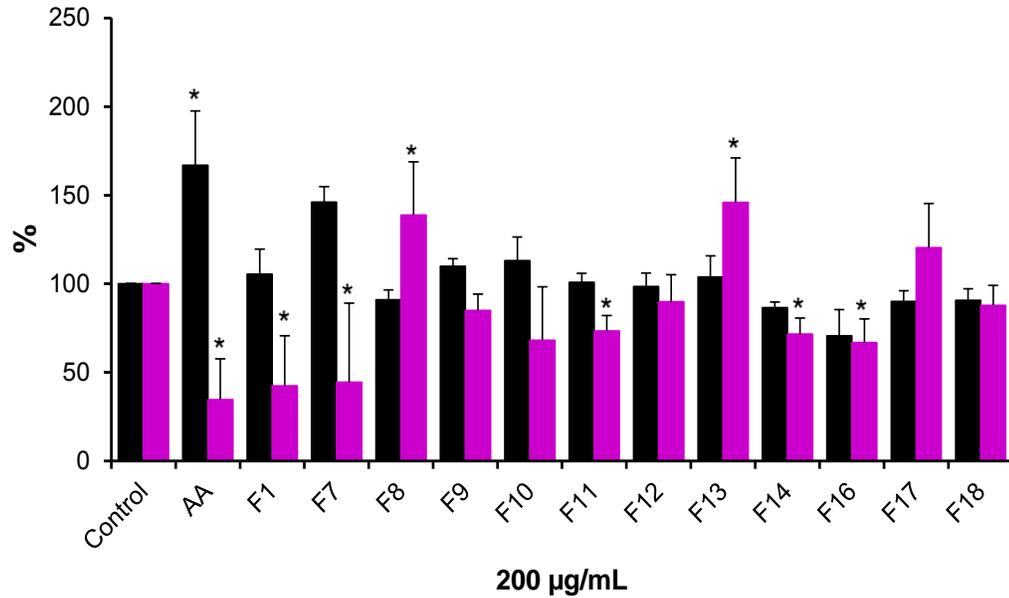
Figura 6. CCF de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens*. A) Placa sin revelar e iluminada con UV 254 nm. B) Placa revelada con vainillina-ácido sulfúrico 10%. La placa se eluyó en un sistema 7:3 (Hexano:Acetato de etilo).

Con el fraccionamiento del extracto hexánico de la corteza, se obtuvieron diversas fracciones. En ninguna de ellas se pudo obtener ácidos anacárdicos o los triterpenos con algún grado de pureza significativa. Sin embargo, se seleccionaron 10 fracciones finales con base al rendimiento obtenido, para determinar su actividad I-SCQ en el sistema de *C. violaceum* en las placas de 96 pozos (Tabla 2).

Se registró actividad I-SCQ en 5 fracciones, ya que no hubo un efecto inhibitorio en el crecimiento en la cepa de *C. violaceum* CV026, al mismo tiempo que se inhibió la producción de violaceína en *C. violaceum* WT *($P < 0.05$) (Figura 7 A y B).

El control positivo, en el que se empleó una mezcla de ácidos anacárdicos (100 $\mu\text{g/mL}$), mostró un incremento del crecimiento de alrededor del 66 % de la cepa *C. violaceum* CV026, *($P < 0.05$).

Las fracciones 1 y 7 (F1, F7) presentaron una inhibición de la violaceína en conjunto del 57%, valor muy similar al del control positivo (mezcla pura de ácidos anacárdicos) que inhibió alrededor del 66% a una dosis de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7A). Las fracciones 11, 14 y 16 (F11, F14, F16), presentaron en conjunto actividad I-SCQ de un 30% *($P < 0.05$).



B

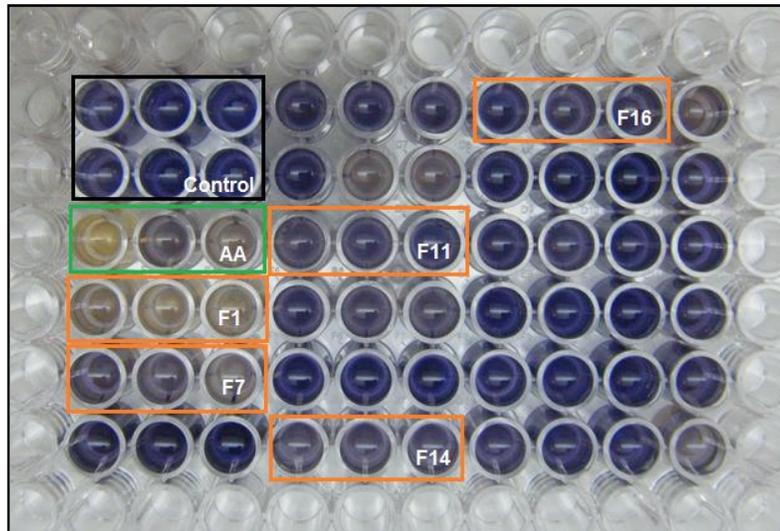


Figura 7. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* (MOCD). A: Gráfica en la que se muestra el efecto de los extractos, en el porcentaje de crecimiento (barras negras) y el de producción de violaceína (barras moradas). B: Placa multipozo del cultivo después de 48 hrs de incubación con los extractos y controles. AA = mezcla de ácidos anacárdicos. * ($P < 0.05$).

5.1.2. Fraccionamiento del extracto diclorometánico de *Amphipterigyum adstringens* y obtención del ácido 3 α -hidroximasticadienónico

Aproximadamente 49 g fueron separados por CC en un sistema de elución hexano: acetato de etilo (Tabla 3).

Tabla 3. Fraccionamiento por cromatografía al vacío del extracto diclorometánico

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Hexano	1:0	3
Hexano-AcOEt	9.5:.5	2

Las 5 fracciones se disolvieron con 500 mL de acetato de etilo, posteriormente se concentraron a 200 mL y se precipitaron con hexano, recristalizándose para obtener el compuesto.

El compuesto 1 se purificó por CC al vacío 30x2 cm, empacada con 21.3 g de gel de sílice y utilizando un gradiente de elución hexano-acetato de etilo. Se obtuvieron 12 fracciones, las cuales se reagruparon en un total de 4 fracciones finales de acuerdo al grado de pureza mostrada en CCF (Tabla 4).

Tabla 4. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del compuesto obtenido del extracto diclorometánico

Fracciones	Eluyente	Clave (g)
1	Hexano: AcOEt 8:2	F1 (0.12 g)
3-5	Hexano: AcOEt 6:4	F2 (0.21 g)
6-9	Hexano: AcOEt 6:4	*F3 (0.13 g)
10-12	Hexano: AcOEt 4:6	F4 (0.09 g)

*Fracciones que se emplearon en los ensayos biológicos. Donde: AcOEt: acetato de etilo

5.1.2.1. Identificación del ácido 3 α -hidroximasticadienónico

Se identificó este compuesto por comparación del patrón cromatográfico en CCF con muestras de referencia de los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico, así como por el análisis de RMN.

El compuesto 1, mostró el perfil típico en el espectro de RMN¹ (figura 8) para el triterpeno 3 α -hidroximasticadienónico (Olivera *et al.*, 1999; Rosas, 2005), con las siguientes señales diagnósticas: ¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm). 6.08 (td, J = 7.5, 1.4 HZ, 1H, H-24); 5.25 (q, J = 2.9 HZ, 1H, H-7); 3.47 (t, J = 2.8 HZ, 1H, H-3); 1.92 (d, J = 1.3 HZ, 3H, Me-27); 0.97 (m, 3H, Me-28); 0.82 (s, 3 H, Me-29); 0.77 (s, 3H, Me-19).

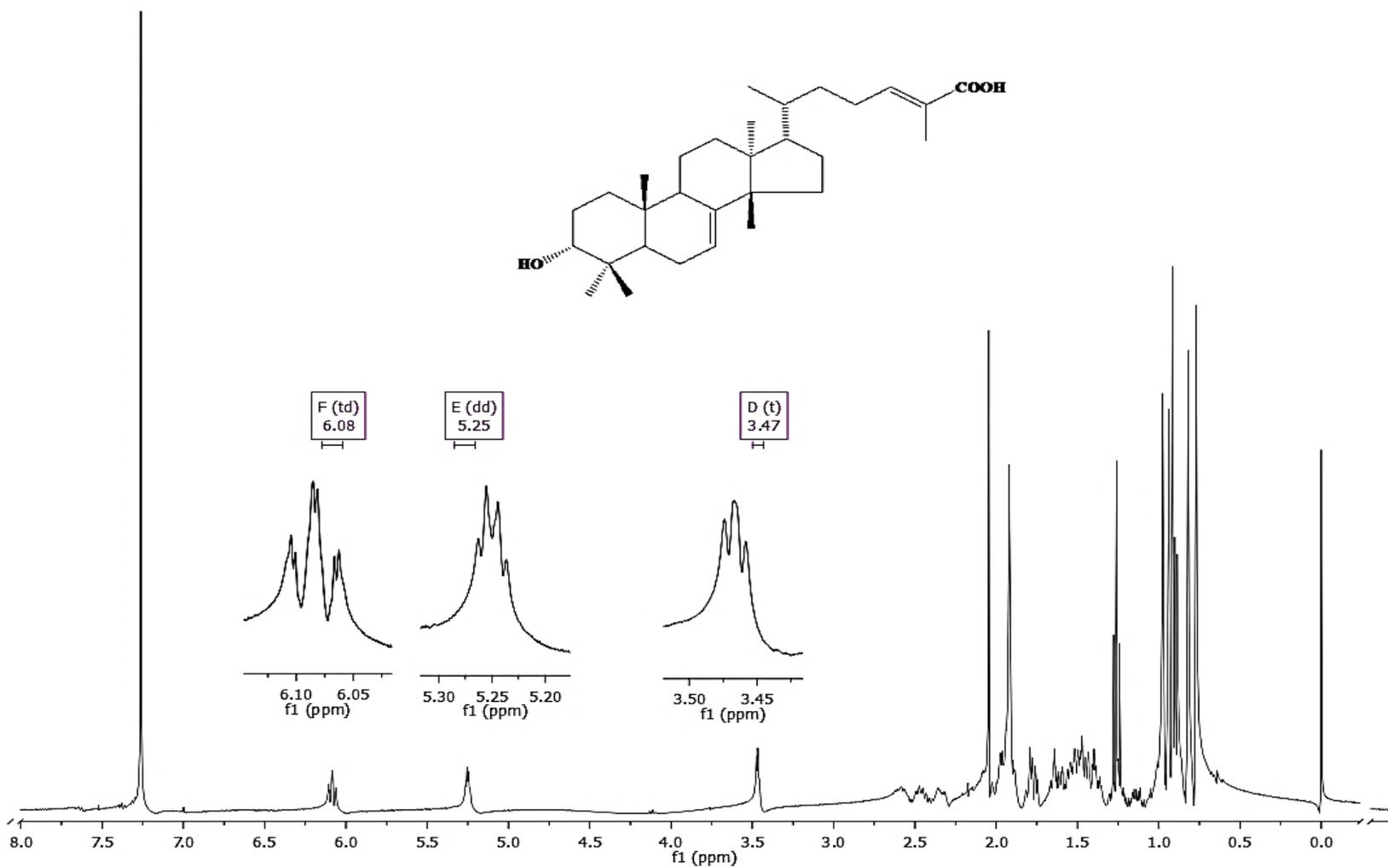


Figura 8. RMNH¹ 3 α -hidroximasticadienónico (compuesto 1).

5.1.2.2. Evaluación de la actividad I-SCQ del ácido 3 α -hidroximasticadienónico

Se evaluó la actividad I-SCQ a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$. En todas las concentraciones se registró un efecto positivo, ya que no tuvieron un efecto inhibitorio del crecimiento en la cepa de *C. violaceum* CV026, al mismo tiempo que inhibieron la producción de violaceína en *C. violaceum* WT *($P < 0.05$) (Figura 9A y B), con excepción de las concentraciones a 100 y 300 $\mu\text{g/mL}$ que tuvieron una ligera inhibición en el crecimiento del 11% *($P < 0.05$).

El control positivo, en el que se empleó una mezcla de ácidos anacárdicos (100 $\mu\text{g/mL}$), mostró un incremento del crecimiento de alrededor del 17 % de la cepa *C. violaceum* CV026, *($P < 0.05$). Un efecto similar, aunque con un 25% lo presentaron las concentraciones a 200, 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$ *($P < 0.05$) (Figura 9A). Con respecto a la inhibición de la violaceína por parte de las diferentes concentraciones, se observó un efecto dosis respuesta, a excepción de la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. La inhibición en general es de alrededor del 64%, valor muy similar al del control positivo (mezcla pura de ácidos anacárdicos) que inhibió alrededor del 72% a una dosis de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9A).

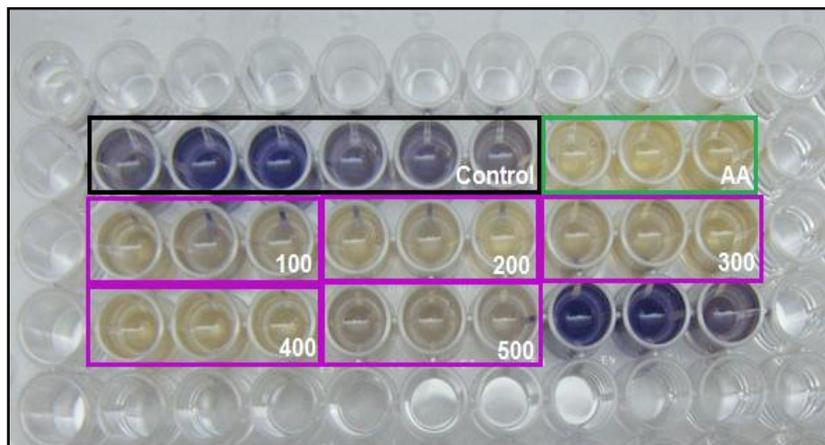
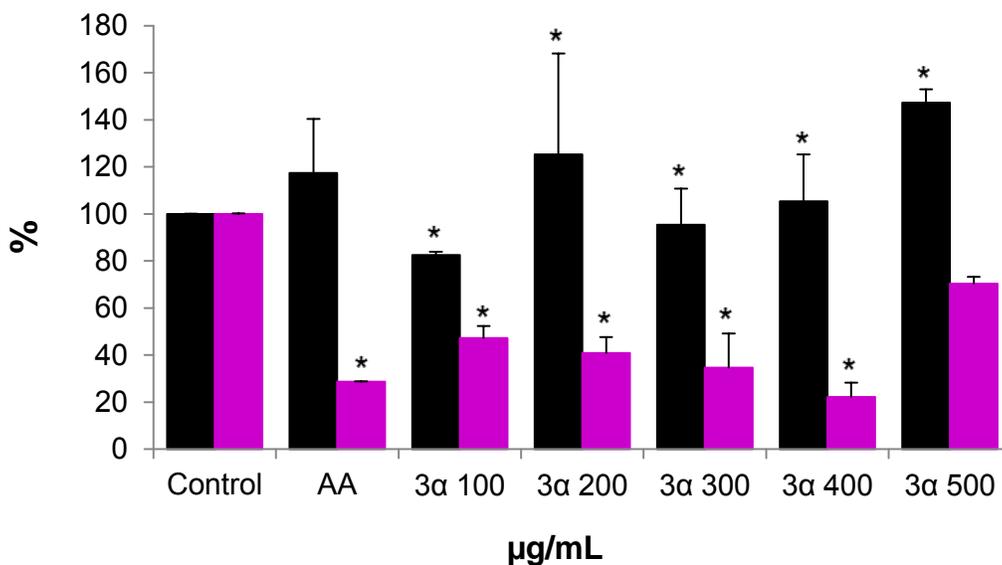


Figura 9. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína del ácido 3 α -hidroximasticadienónico. A: Gráfica en la que se muestra el efecto de las diferentes concentraciones, en el porcentaje de crecimiento (barras negras) y el de producción de violaceína (barras moradas). B: Placa multipozo del cultivo después de 48 hrs de incubación con los extractos y controles. AA = mezcla de ácidos anacárdicos. * (P < 0.05).

5.1.3. Efecto del extracto hexánico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* y una fracción rica en ácidos anacárdicos, sobre las lesiones producidas por daño térmico e infectadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

La sobrevivencia de los animales inoculados con *P. aeruginosa* en el modelo de daño térmico, fue distinta en las diferentes condiciones experimentales. Al cabo de 24 hrs post-inoculación todos los animales sobrevivieron, sin embargo al segundo día se registró la muerte de un animal en el grupo tratado con HE 55.3 mg/ml y dos en los tratados con la FRANA 500 mg/ml (Tabla 5). Al tercer día de experimentación todos los animales tratados con la FRANA murieron al igual que un control tratado con aceite de canola, mientras que la sobrevivencia de las demás condiciones experimentales, se mantuvo igual hasta los doce días en que concluyó el experimento (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del EH y FRANA en la sobrevivencia de ratones con daño térmico e infectados con *Pseudomonas aeruginosa*.

	Animales vivos (Días)			
	1	2	3	4-12
Control: aceite de canola	3	3	2	2
EH 166 mg/mL	3	3	3	3
EH 55.3 mg/mL	3	2	2	2
FRANA 500 mg/mL	3	1	0	0

A los doce días, en el grupo tratado con HE 55.5 mg/mL se redujo la lesión e incluso desapareció por completo en uno de ellos, además de que presentaron aparición de pelo en la periferia de la zona dañada (figura 10H).

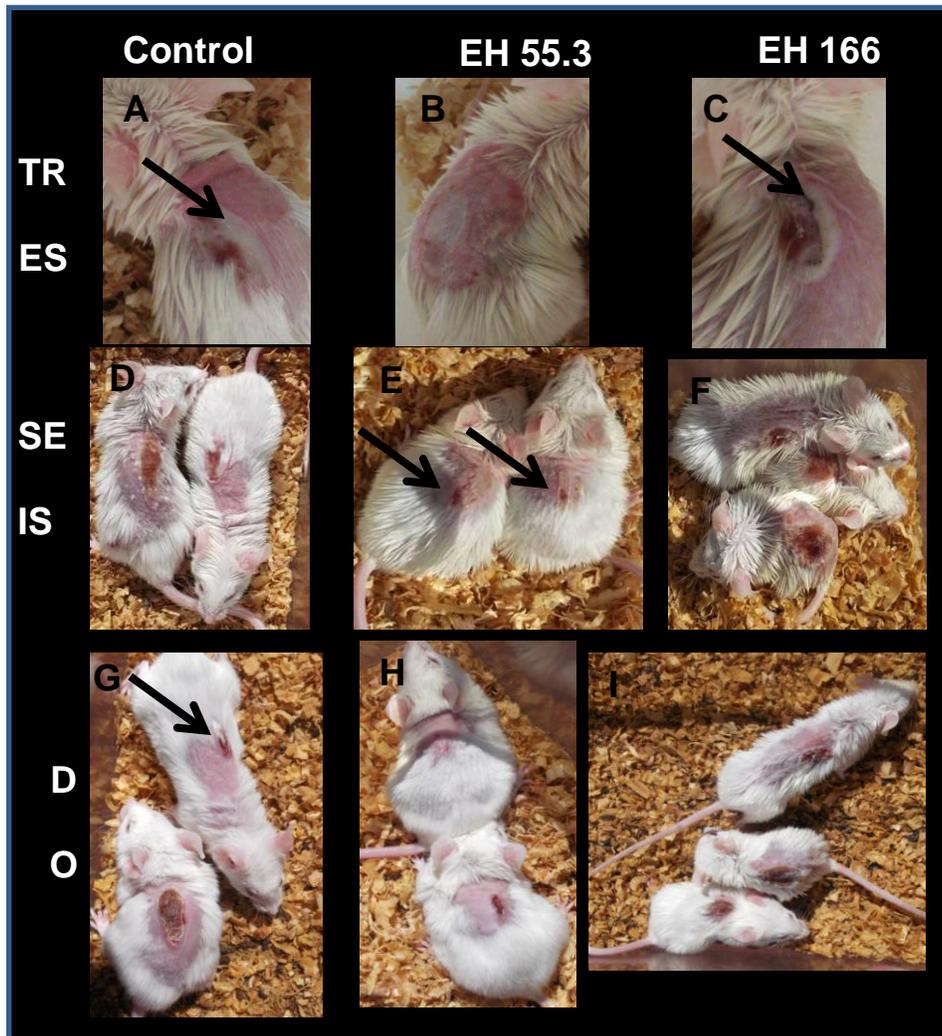


Figura 10. Efecto del EH sobre las lesiones producidas en el modelo de daño térmico y el estado general de los animales. Control: tratados únicamente con aceite de canola. HE: extracto hexánico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* a dos concentraciones 55.3 y 166 mg/ml. Flechas en A y C, señalan un abultamiento blanquecino producido por la infección de *Pseudomonas aeruginosa*. Las flechas en E y G, señalan las lesiones que fueron disminuyendo en el transcurso de experimento.

El grupo control tratado con aceite de canola, incrementó el movimiento, y disminuyó la piloerección, al mismo tiempo que se redujo la lesión en uno de los animales (Figura 10G). Para el caso de los tratados con HE 166 mg/mL la apariencia de los animales no cambió, se mantuvieron con poco movimiento y piloerección; además de que las lesiones no disminuyeron y presentaron un endurecimiento (Figura 10I).

Los animales fueron sacrificados a los 12 días post-inoculación, para cuantificar la presencia de *P. aeruginosa* en las lesiones. Para el caso de los tratados con HE 55.5 mg/ml no se detectó la presencia de *P. aeruginosa*, no así en los controles tratados con aceite de canola, en el cual se cuantificó un promedio de log UFC de 7.75 ± 7.07 (figura 11).

La desviación estándar es amplia, debido a que en uno de los animales controles, específicamente en el que se redujo la lesión a los 12 días el número de log UFC fue de 3.5, mientras que el otro fue de 12 (Figura 10G). Para el caso de los animales tratados con HE 166 mg/ml a pesar de que no se registró ninguna muerte a lo largo del experimento, se cuantificó un promedio de log UFC de 11.21 ± 0.36 , resultando con mayor grado de infección, que los controles tratados con aceite canola * ($P < 0.05$).

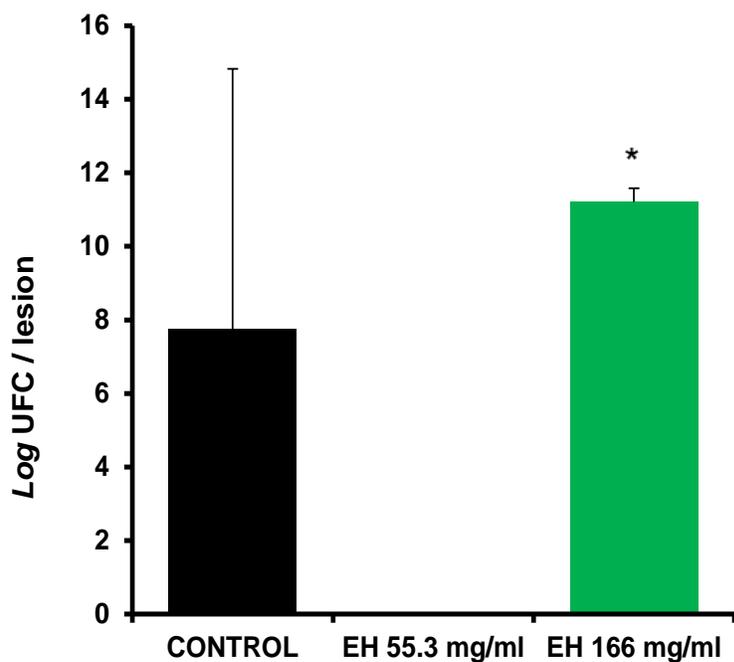


Figura 11. Cuantificación de *Pseudomonas aeruginosa* en lesiones de los animales a los 12 días post-infección. Control: animales tratados únicamente con aceite de canola. HE: extracto hexánico de la corteza de *Amphipterigyum adstringens* a dos concentraciones 55.3 y 166 mg/ml. El número de bacterias presentes en los ratones tratados con HE fue mayor al del grupo control *($P < 0.05$).

5.2. Identificación de las especies del género *Ceiba*.

Las cortezas de *C. pentandra* y *C. aesculifolia* se colectaron en los estados de Oaxaca y Veracruz respectivamente, durante el mes de mayo de 2013. En la tabla 6 se muestran los datos obtenidos del herbario CHAP y en la tabla 7 el rendimiento obtenido de las extracciones con los diferentes solventes orgánicos.

Tabla 6. Datos de herbario de los especímenes colectados

Nombre científico:	<i>Ceiba aesculifolia</i>	<i>Ceiba pentandra</i>
Nombre común:	Pochote	Pochote
Familia	Malvaceae	Malvaceae
No. de registro	66,487 y 66,488	66,486

Tabla 7. Rendimientos obtenidos de las cortezas con solventes orgánicos

Especie	Peso (g)		
	Hexano	Diclorometano	Metanol
<i>Ceiba sp.</i>	1.3	2	29.4
<i>Ceiba pentandra</i>	3.37	5.22	
<i>Ceiba aesculifolia</i>	2.42	4.32	

A partir de 1 kg de peso seco

En la figura 12 se muestra la diversidad de metabolitos presentes en las tres cortezas mediante el análisis en CCF. Se hace evidente la presencia de metabolitos de naturaleza terpénica, debido a que varios reaccionaron virando a un color azul y magenta con el agente cromógeno vainillina-ácido sulfúrico. También se observan metabolitos de una naturaleza química diferente ya que se tornan de un color café, principalmente en los extractos de *Ceiba aesculifolia*.

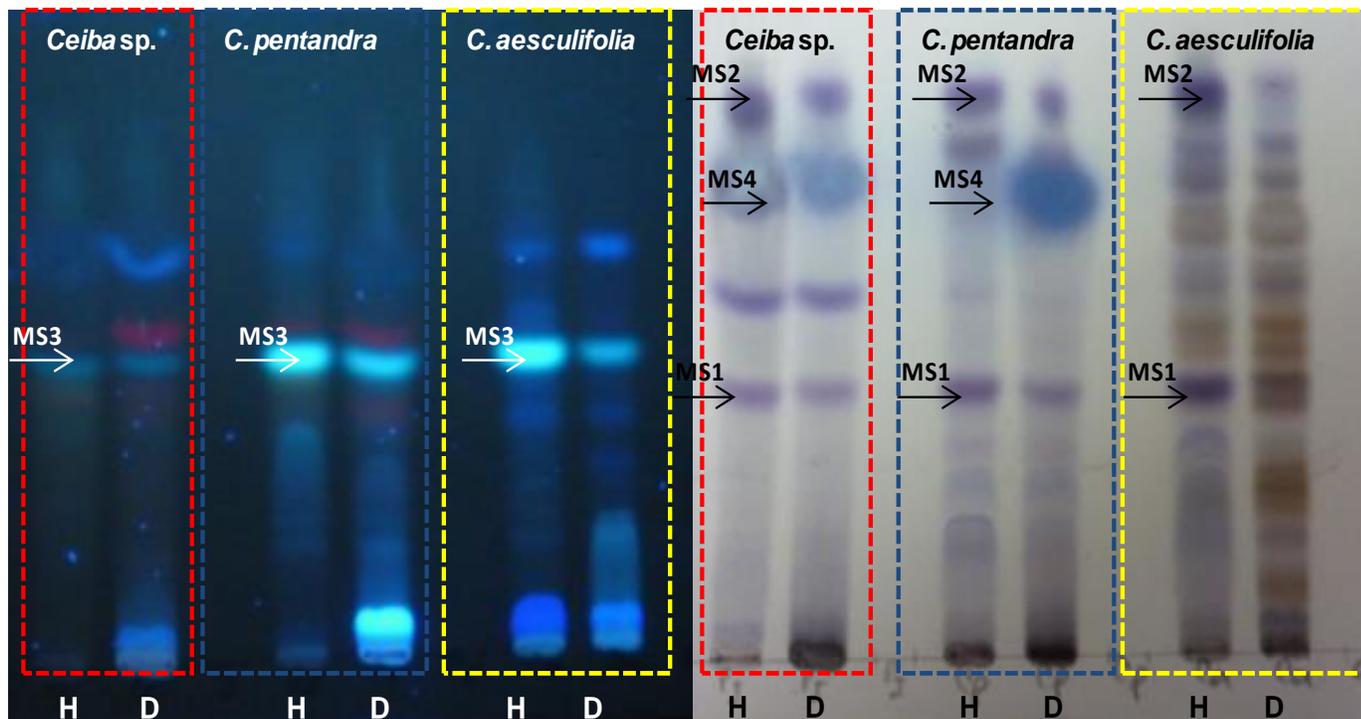


Figura 12. Comparación de constituyentes químicos de las cortezas de *Ceiba*. CCF del extracto hexánico (H) y diclorometánico (D), de las cortezas de *Ceiba* sp., *Ceiba pentandra* y *Ceiba aesculifolia*. La placa se eluyó en un sistema 6:4 (Hexano: Acetato de Etilo) y se reveló con Vainillina al 2% y H₂SO₄ al 10%.

Bajo condiciones experimentales de este estudio, en la placa se evidencia que los extractos hexánico y diclorometánico de *C. aesculifolia* contiene un mayor número de metabolitos con respecto a *Ceiba* sp. y *C. pentandra* (figura 12), sin embargo, las tres muestras comparten algunos metabolitos secundarios mayoritarios de naturaleza terpénica, como son los MS1 y MS2, al igual que uno con dobles ligaduras o con presencia de metabolitos aromáticos como es el MS3 (figura 12).

Un metabolito muy abundante que viró a color azul, indicativo de la presencia de grupos OH, y denominado MS4, únicamente está presente en las muestras de *Ceiba* sp. y *C. pentandra* (Figura 12) .

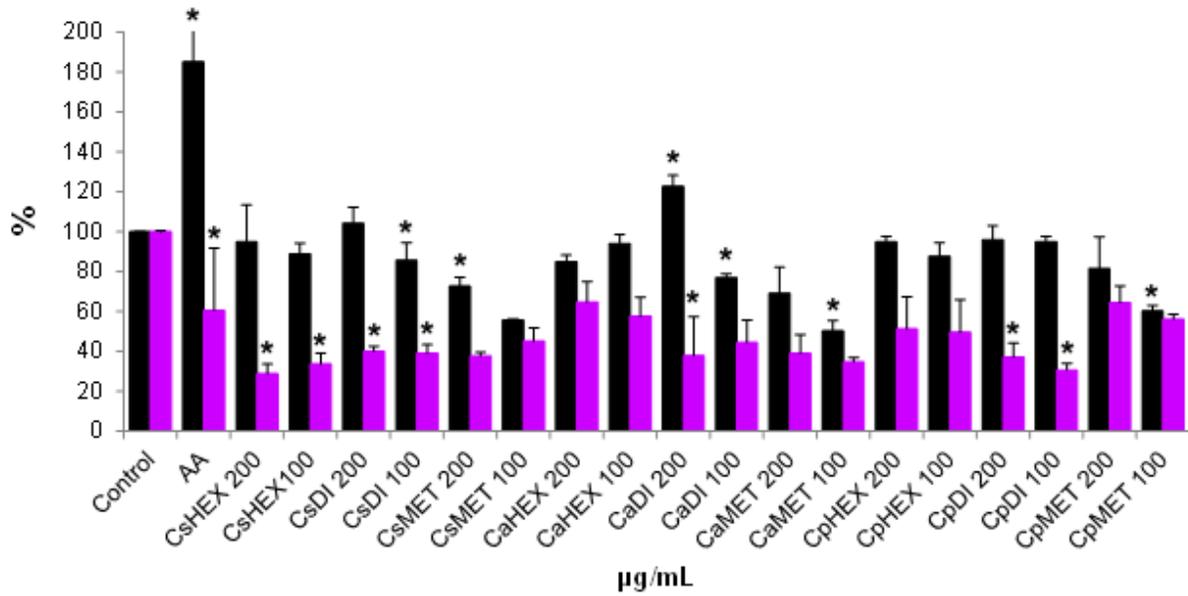
El análisis general de los patrones de metabolitos en CCF, nos indica que la muestra denominada *Ceiba* sp. que se comercializa al menos en el sitio de compra de este estudio, guarda mayor similitud con *C. pentandra*, sin embargo, en *Ceiba* sp. se puede apreciar que contiene un menor número o concentración de metabolitos (Figura 12).

5.2.1. Actividad I-SCQ de las cortezas de *ceiba*.

Se evaluó la actividad I-SCQ de los extractos de las cortezas de *Ceiba* a concentraciones de 100 y 200 µg/mL. Se registró actividad I-SCQ principalmente en los extractos hexánicos y diclorometánicos, ya que no tuvieron un efecto inhibitorio del crecimiento en la cepa de *C. violaceum* CV026, al mismo tiempo que inhibieron la producción de violaceína en *C. violaceum* WT *(P < 0.05). Figura 13A y B. La excepción fue el extracto diclorometánico de *C. aesculifolia* a 100 µg/mL (CaDI 100) inhibió el crecimiento alrededor del 26% *(P < 0.05).

Del mismo modo, se registró un efecto negativo en el crecimiento de los extractos metanólicos de las tres muestras *(P < 0.05), por lo que la inhibición de la violaceína puede deberse a la presencia de moléculas antibióticas, presentes en estos extractos (Figura 13A).

A



B

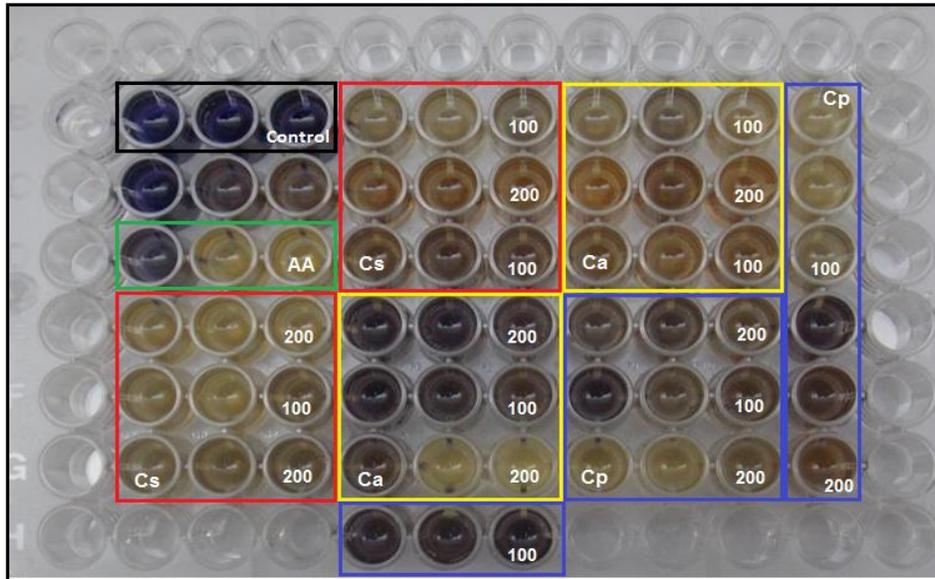


Figura 13. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de los extractos de *Ceibas*. A: Gráfica en la que se muestra el efecto de los extractos, en el porcentaje de crecimiento (barras negras) y el de producción de violaceína (barras moradas). Cs= *Ceiba* sp; Ca= *Ceiba aesculifolia*; Cp= *Ceiba pentandra*; Hex= extracto hexánico; DI= extracto diclorometánico; M= metanólico. B: Placa multipozo del cultivo después de 48 hrs de incubación con los extractos y controles. AA = mezcla de ácidos anacárdicos. * (P < 0.05).

El control positivo, en el que se empleó una mezcla de ácidos anacárdicos (100 µg/mL), mostró un incremento del crecimiento de alrededor del 85 % de la cepa *C. violaceum* CV026, *(P < 0.05). Un efecto similar, aunque con un 25% lo presentó el extracto de *C. aesculifolia* a 200 mg/mL (CaDI 200) *(P < 0.05) (Figura 13A).

Los extractos hexánicos y diclorometánicos a dosis de 100 y 200 µg/mL inhibieron la violaceína y no se observó un efecto dosis respuesta, pero la inhibición en general fue de alrededor del 57%, valor muy similar al del control positivo (mezcla pura de ácidos anacárdicos) que inhibió alrededor del 40% a una dosis de 100 µg/mL (Figura 13A).

5.2.2. Fraccionamiento de extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba aesculifolia*.

Se utilizaron 2.42 g de extracto hexánico los cuales fueron separados por cromatografía en columna, empleando un gradiente de elución de hexano: acetato de etilo., obteniéndose 8 fracciones (tabla 8).

Tabla 8. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto hexánico de *Ceiba aesculifolia*

Sistema de elución	Proporción	Clave (g)
Hexano	1:0	CaHEX F1 (.006)
Hexano-AcOEt	9:1	*CaHEX F2 (0.485)
Hexano-AcOEt	8:2	*CaHEX F3 (0.352)
Hexano-AcOEt	6:4	*CaHEX F4 (0.282)
Hexano-AcOEt	3:7	*CaHEX F5 (0.129)
AcOEt-Metanol	9:1	*CaHEX F6 (0.086)
AcOEt-Metanol	7:3	*CaHEX F7 (0.093)
Metanol	1:0	*CaHEX F8 (0.020)

*Fracciones utilizadas en el ensayo biológico

Del extracto diclorometánico se utilizaron 4.32 g y se obtuvieron 12 fracciones, el sistema de elución y rendimiento obtenido se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto diclorometánico de *Ceiba aesculifolia*

Sistema de elución	Proporción	Clave (g)
Hexano	1:0	CaDI F1 (NP)
Hexano-AcOEt	9:1	*CaDI F2 (0.115)
Hexano-AcOEt	8:2	*CaDI F3 (0.325)
Hexano-AcOEt	7:3	*CaDI F4 (0.117)
Hexano-AcOEt	6:4	*CaDI F5 (0.150)
Hexano-AcOEt	5:5	*CaDI F6 (0.105)
Hexano-AcOEt	3:7	*CaDI F7 (0.084)
Hexano-AcOEt	2:8	*CaDI F8 (0.043)
AcOEt	1:0	*CaDI F9 (0.054)
AcOEt:Metanol	8:2	*CaDI F10 (0.644)
AcOEt:Metanol	5:5	*CaDI F11 (0.188)
Metanol	1:0	*CaDI F12 (.088)

*Fracciones utilizadas en el ensayo biológico.

5.2.2.1. Actividad I-SCQ de las fracciones de *Ceiba aesculifolia*.

Se registró la actividad I-SCQ en la fracción 6 del extracto hexánico, ya que no tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento en la cepa de *C. violaceum* CV026, al mismo tiempo que inhibió la producción de violaceína en *C. violaceum* WT *(P < 0.05) (Figura 14 A y B). Aunque se observa una inhibición en la violaceína en la fracción 5

(CaHex F5), presenta un efecto negativo en el crecimiento del 8% por lo que la inhibición puede deberse al efecto antibiótico que pudiera tener la fracción (Figura 14 A).

El control positivo (ácidos anacárdicos) a una dosis de 100 µg/mL, mostró un incremento en el crecimiento del 50 % de la cepa *C. violaceum* CV026, *(P < 0.05) con respecto al control (Figura 14A). Un efecto similar, con un incremento del 30% lo presentaron las fracciones 6 y 7 (CaHEX F6 y CaHEX F7) *(P < 0.05) (Figura 14 A).

La inhibición de la violaceína presentada por la fracción 5 y 6 (CaHEX F5 y F6) fue de un 70%, valor muy cercano al del control positivo (mezcla de ácidos anacárdicos) que fue del 80 % a una dosis de 100 µg/mL *(P < 0.05) (Figura 14 A).

En el extracto diclorometánico, las fracciones 4 y 11 (CaDI F4 y CaDI F7) presentaron actividad I-SCQ al no mostrar un efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa *C. violaceum* CV026 (Figura 15 A y B). Las fracciones 2 y 3 (CaDi F2 y F3), por el contrario aumentaron la producción de violaceína en un 52% en comparación con el control *(P < 0.05) (Figura 14A).

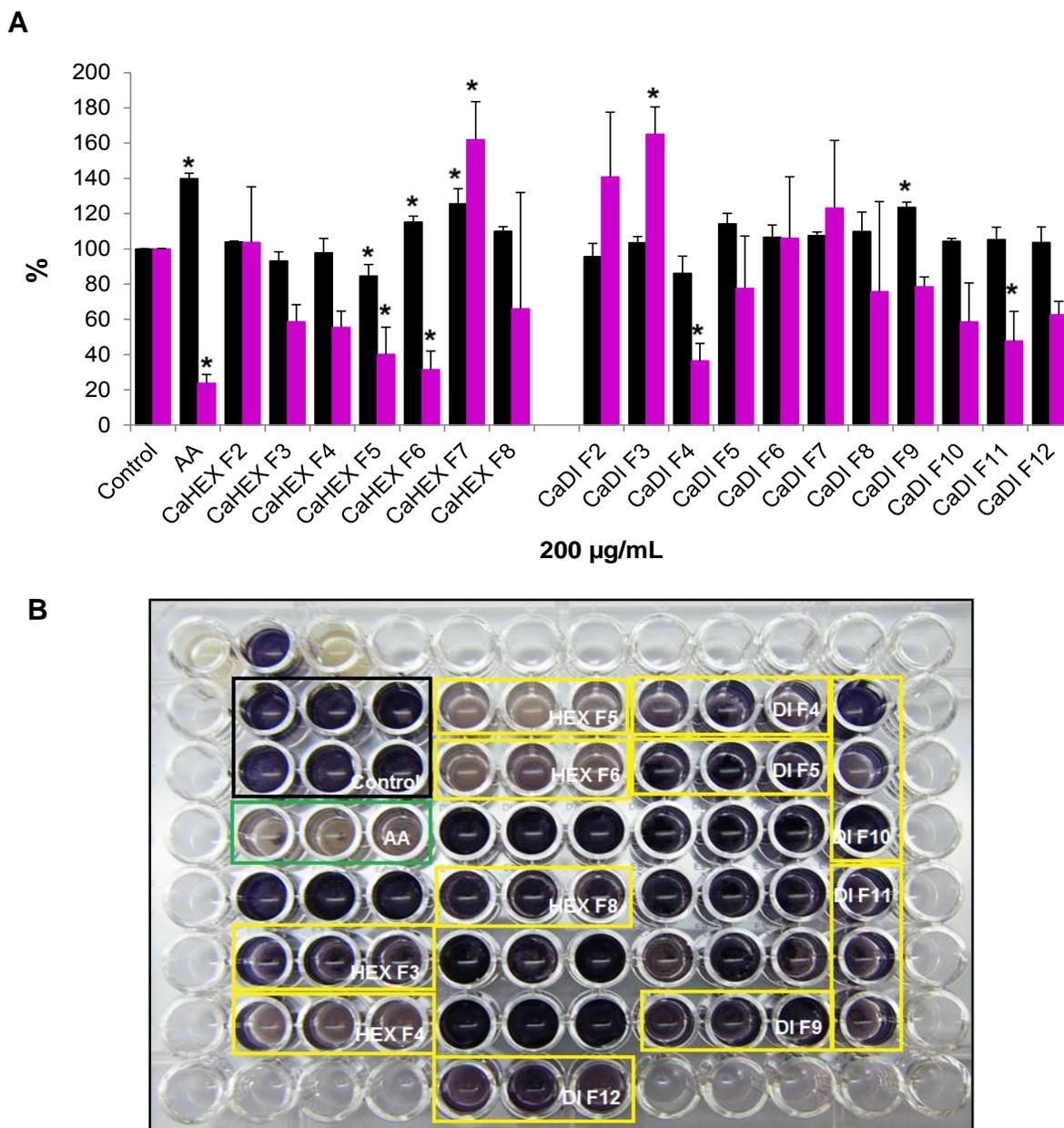


Figura 14. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba aesculifolia*. A: Gráfica en la que se muestra el efecto de los extractos en el crecimiento (barras negras) y la producción de violaceína (barras moradas). B: Placa multipozo del cultivo después de 48 hrs de incubación con los fracciones y controles. AA = mezcla de ácidos anacárdicos. *($P < 0.05$).

Las fracciones 4 y 11 (CaDi F4 y F11) presentaron una inhibición en la producción de violaceína del 70% valor muy cercano al que presentó en control positivo que fue del 80 % a una dosis de 100 $\mu\text{g/mL}$ *($P < 0.05$) (Figura 15A).

Aunque las fracciones 5, 10, 11, 12 muestran una disminución en la producción de violaceína en la placa multipozo (Figura 15B), en análisis estadístico no muestra una diferencia significativa con respecto a los controles y muestran menor efectividad con respecto a los ácidos anacárdicos.

5.2.3. Fraccionamiento de extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba pentandra*.

3.37g de extracto hexánico se separaron por cromatografía en columna, empleando un gradiente de elución de hexano: acetato de etilo., obteniéndose 6 fracciones (Tabla 10).

Tabla 10. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto hexánico de *Ceiba pentandra*

Sistema de elución	Proporción	Clave (g)
Hexano	1:0	*CpHEX F1 (0.01)
Hexano-AcOEt	9:1	*CpHEX F2 (0.29)
Hexano-AcOEt	8:2	*CpHEX F3 (0.52)
Hexano-AcOEt	6:4	*CpHEX F4 (0.31)
Hexano-AcOEt	3:7	*CpHEX F5 (0.10)
AcOEt	1:0	CpHEX F6 (0.08)
Metanol	1:0	*CpHEX F7 (0.19)

*Fracciones utilizadas en el ensayo biológico

Del extracto diclorometánico se utilizaron 5.22 g y se obtuvieron 12 fracciones, el sistema de elución y rendimiento obtenido se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto diclorometánico de *Ceiba pentandra*

Sistema de elución	Proporción	Clave (g)
Hexano	1:0	CpDI F1 (0.001)
Hexano-AcOEt	9:1	*CpDI F2 (0.01)
Hexano-AcOEt	8:2	*CpDI F3 (0.04)
Hexano-AcOEt	7:3	*CpDI F4 (0.16)
Hexano-AcOEt	6:4	*CpDI F5 (0.17)
Hexano-AcOEt	5:5	*CpDI F6 (0.02)
Hexano-AcOEt	3:7	*CpDI F7 (0.04)
Hexano-AcOEt	2:8	*CpDI F8 (0.05)
AcOEt	1:0	*CpDI F9 (0.02)
AcOEt:Metanol	8:2	*CpDI F10 (0.37)
AcOEt:Metanol	5:5	*CpDI F11 (0.31)
Metanol	1:0	*CpDI F12 (0.11)

*Fracciones utilizadas en el ensayo biológico

5.2.3.1. Actividad I-SCQ de las fracciones de *Ceiba pentandra*

Se registró la actividad ISCQ en la fracción 4 del extracto hexánico, ya que no tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento en la cepa de *C. violaceum* CV026, al mismo tiempo que inhibió la producción de violaceína en *C. violaceum* WT *(P < 0.05) (Figura 15 A y B).

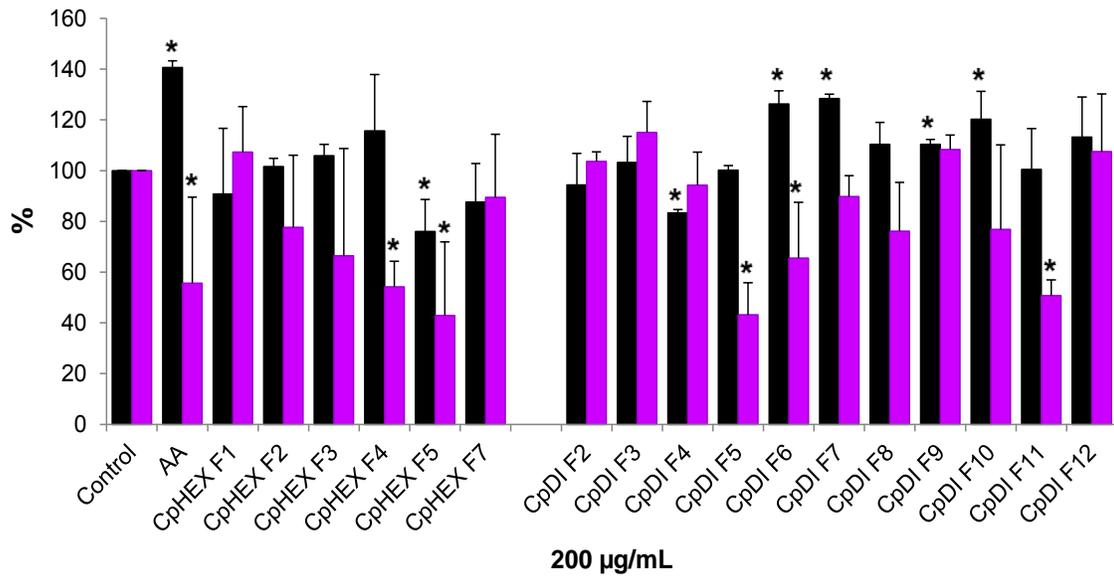
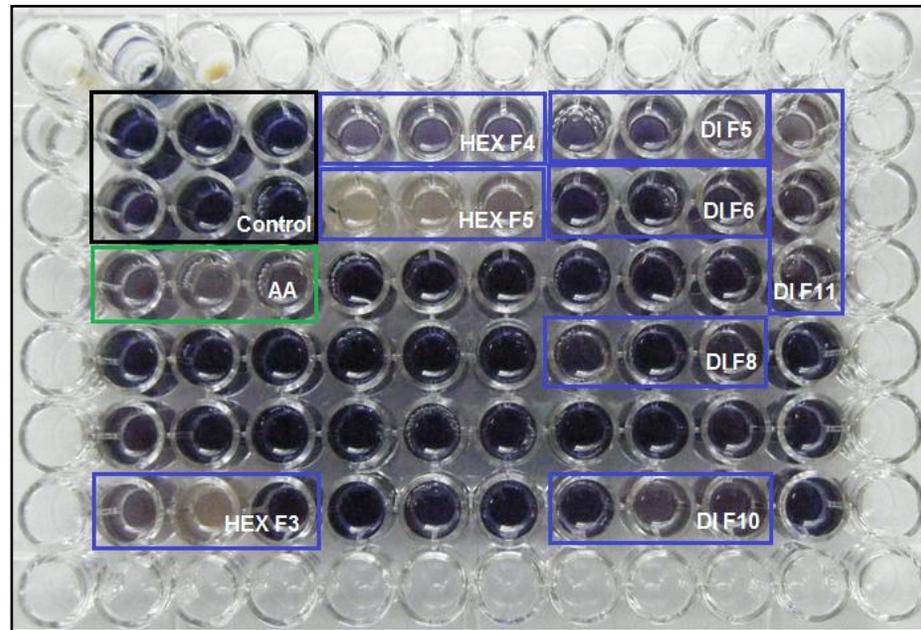
A**B**

Figura 15. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba pentandra*. **A:** Gráfica en la que se muestra el efecto de los extractos en el crecimiento (barras negras) y la producción de violaceína (barras moradas). **B:** Placa multipozo del cultivo después de 48 hrs de incubación con los fracciones y controles. AA = mezcla de ácidos anacárdicos. *($P < 0.05$).

Aunque en la gráfica se observa una inhibición en la violaceína en la fracción 5 (CpHex F5), presenta un efecto negativo en el crecimiento del 25% por lo que la fracción puede tener un efecto antibiótico (Figura 15A) *(P < 0.05).

La mezcla de ácidos anacárdicos (control positivo) a una dosis de 100 µg/mL, mostró un incremento en el crecimiento del 40 % de la cepa *C. violaceum* CV026, *(P < 0.05) con respecto al control (Figura 15A).

Con respecto a la inhibición de la violaceína por parte de la fracción 4 (CpHEX F4), ésta presenta un valor ligeramente por arriba del control positivo (46%) que fue del 45% a una dosis de 100 µg/mL *(P < 0.05) (Figura 15A).

En el extracto diclorometánico, las fracciones 5, 6 y 11 (CpDI F5, CpDI F6 y CpDI F11) presentaron actividad I-SCQ al no mostrar un efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa *C. violaceum* CV026 *(P < 0.05), pero presentaron una inhibición en la producción de violaceína en *C. violaceum* WT *(P < 0.05) (Figura 15A y B). Al igual que el control positivo las fracciones 6, 7, 9 y 10 mostraron un incremento en el crecimiento de *C. violaceum* CV026 del 20% con respecto al control *(P < 0.05) (Figura 15A).

Se observa un efecto en la placa de la fracción 3 (HEX F3) (Figura 15B), pero al hacer el análisis estadístico no se muestra una diferencia significativa.

La inhibición de la violaceína en general de las fracciones 5, 6 y 11 (CpDI F5, F6 y F11) fue de un 53%, valor por encima del control positivo que fue del 45% a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *($P < 0.05$) (Figura 15A).

Aunque en las fracciones del extracto hexánico 3 y 4 (HEX F3 y F4) y las 8 y 10 (DI 8 y 10) del extracto diclorometánico, se observa en los diferentes pozos una disminución en la producción de violaceína (Figura 15B), en el análisis estadístico no se obtuvo una diferencia significativa.

5.2.4. Fraccionamiento del extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba* sp. y su actividad I-SCQ.

Aproximadamente 1.3 g de extracto hexánico fueron separados por CC, empleando un gradiente de elución de hexano: acetato de etilo., obteniéndose 7 fracciones (Tabla 12).

Tabla 12. Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto hexánico de *Ceiba* sp.

Sistema de elución	Proporción	Clave (g)
Hexano	1:0	CsHEX F1 (NP)
Hexano-AcOEt	8:2	*CsHEX F2 (0.298)
Hexano-AcOEt	7:3	*CsHEX F3 (0.185)
Hexano-AcOEt	5:5	*CsHEX F4 (0.084)
Hexano-AcOEt	3:7	*CsHEX F5 (0.063)
AcOEt	1:0	*CsHEX F6 (0.02)
Metanol	1:0	*CsHEX F7 (0.01)

*Fracciones utilizadas en el ensayo biológico

Del extracto diclorometánico se utilizaron 2 g y se obtuvieron 13 fracciones, el sistema de elución y rendimiento obtenido se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Fraccionamiento por cromatografía en columna al vacío del extracto diclorometánico de *Ceiba sp.*

Sistema de elución	Proporción	Clave (g)
Hexano	1:0	CsDI F1 (NP)
Hexano-AcOEt	8:2	*CsDI F2 (0.02)
Hexano-AcOEt	7:3	*CsDI F3 (0.016)
Hexano-AcOEt	5:5	*CsDI F4 (0.2)
Hexano-AcOEt	3:7	*CsDI F5 (0.07)
Hexano-AcOEt	2:8	*CsDI F6 (0.04)
AcOEt	1:0	*CsDI F7 (0.05)
AcOEt:Metanol	9:1	*CsDI F8 (0.26)
AcOEt:Metanol	8:2	*CsDI F9 (0.47)
AcOEt:Metanol	6:4	*CsDI F10 (0.073)
AcOEt:Metanol	4:6	*CsDI F11 (0.087)
Etanol	1:0	*CsDI F12 (0.038)
Metanol	1:0	*F-13DiCs (0.03)

*Fracciones utilizadas en el ensayo biológico

5.2.4.1. Evaluación de la actividad I-SCQ de las fracciones de *Ceiba sp.*

En las fracciones obtenidas del extracto hexánico de *Ceiba sp.*, no se mostró actividad I-SCQ, ya que ninguna fracción presentó una inhibición cercana o por debajo del control positivo (ácidos anacárdicos) que fue de un 50%, la mayoría tuvo

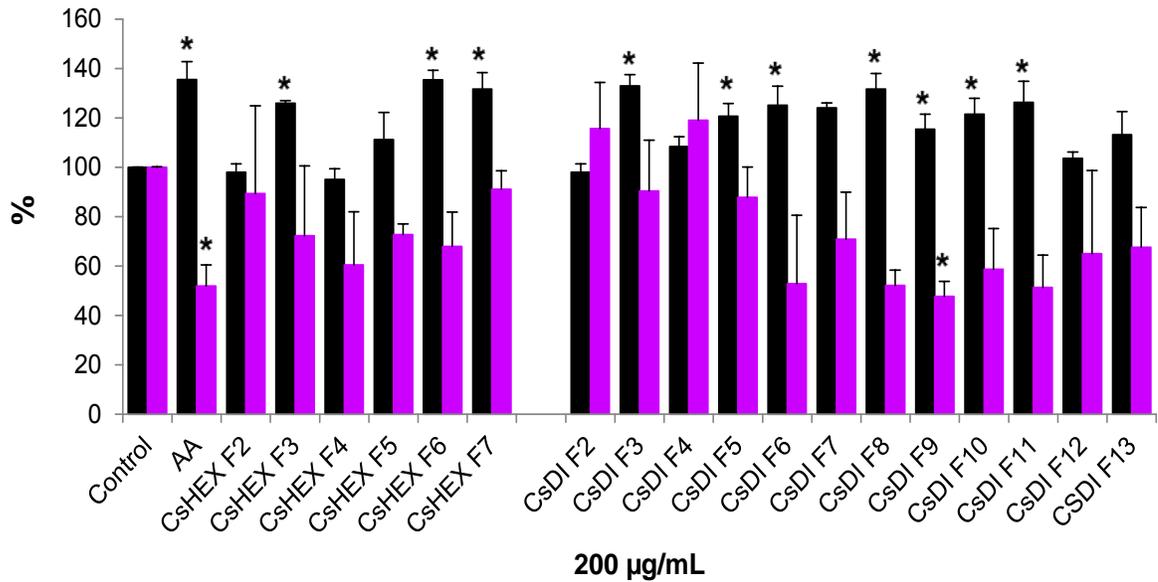
un efecto en el crecimiento en la cepa *C. violaceum* CV026, incrementándose un 18% con respecto al control *(P < 0.05) (Figura 16 A). Las fracciones 4 y 5 (Cs HEX F4 y F5) tal vez no tengan una actividad similar al anacárdico pero si tiene actividad I-SCQ como se puede observar en la placa multipozo (Figura 16B).

En las fracciones obtenidas de extracto diclorometánico de la 6 a la 11 presentaron actividad I-SCQ, ya que no afectaron el crecimiento de la cepa *C. violaceum* CV026 y si disminuyeron la producción de violaceína* (P < 0.05).

El control positivo, en el que se empleó una mezcla de ácidos anacárdicos (100 µg/mL), mostró un incremento en el crecimiento del 35 % de la cepa *C. violaceum* CV026 *(P < 0.05) (Figura 14 A). Un efecto similar, aunque con un 18% en el incremento del crecimiento de dicha cepa, lo presentan las fracciones 3 a 11 con respecto al control *(P < 0.05) (figura 16 A).

Con respecto a la inhibición de la violaceína por parte de la fracción 9 (CsDI F9) a una dosis de 200 µg/mL, fue de un 53%, valor muy similar al del control positivo (mezcla de ácidos anacárdicos) que fue de un 50% a una dosis de 100 µg/mL de la (Figura 16 A y B).

A



B

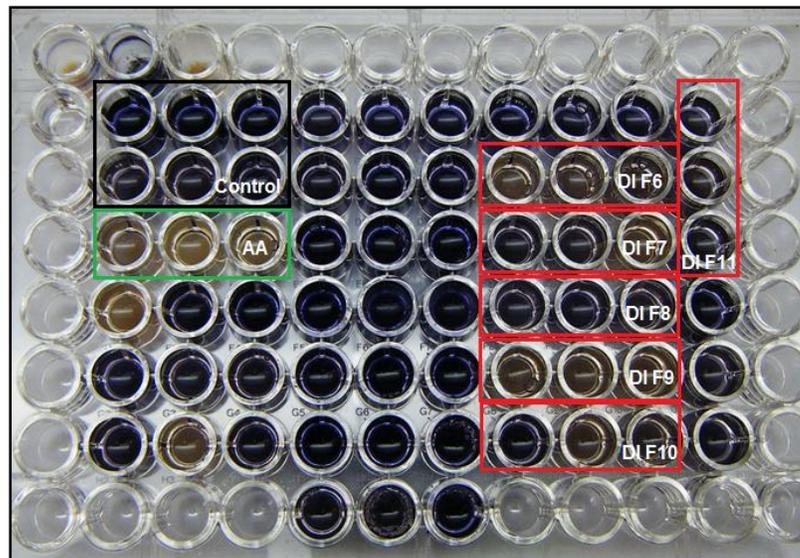


Figura 16. Efecto sobre el crecimiento y producción de violaceína de las fracciones obtenidas del extracto hexánico y diclorometánico de *Ceiba sp.* **A:** Gráfica en la que se muestra el efecto de los extractos en el crecimiento (barras negras) y la producción de violaceína (barras moradas). **B:** Placa multipozo del cultivo después de 48 hrs de incubación con los fracciones y controles. AA= mezcla de ácidos anacárdicos. *(P < 0.05).

En los pozos se observa también que las fracciones 6, 7,8, 10 y 11 disminuyeron la producción de violaceína, sin embargo el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa con respecto a los controles (Figura 16B).

5.3. Comparación en CCF de los metabolitos presentes en las fracciones activas de las cortezas de ceibas

La CCF de las fracciones activas muestran una diversidad de metabolitos de naturaleza terpénica ya que viran a color azul y magenta al ser reveladas con el agente cromógeno vainillina-ácido sulfúrico. También se puede observar marcas con colores distintos y fluorescencia en UV 254 nm, que puede indicar la presencia de moléculas de dobles ligaduras, como pueden ser anillos bencénicos (Figuras 17 y 18). Pueden ser indicativos de presencia de otro tipo de metabolitos que pueden ser de flavonoides o compuestos de naturaleza fenólica.

La composición de metabolitos de las fracciones activas de los extractos de *C.aesculifolia*, *C. pentandra* y *Ceiba* sp. fue diferente entre sí (Figura 17 y 18). En los extractos hexánico y diclorometánico de *C. pentandra* fue evidente una mayor cantidad de metabolitos, en comparación con las otras cortezas.

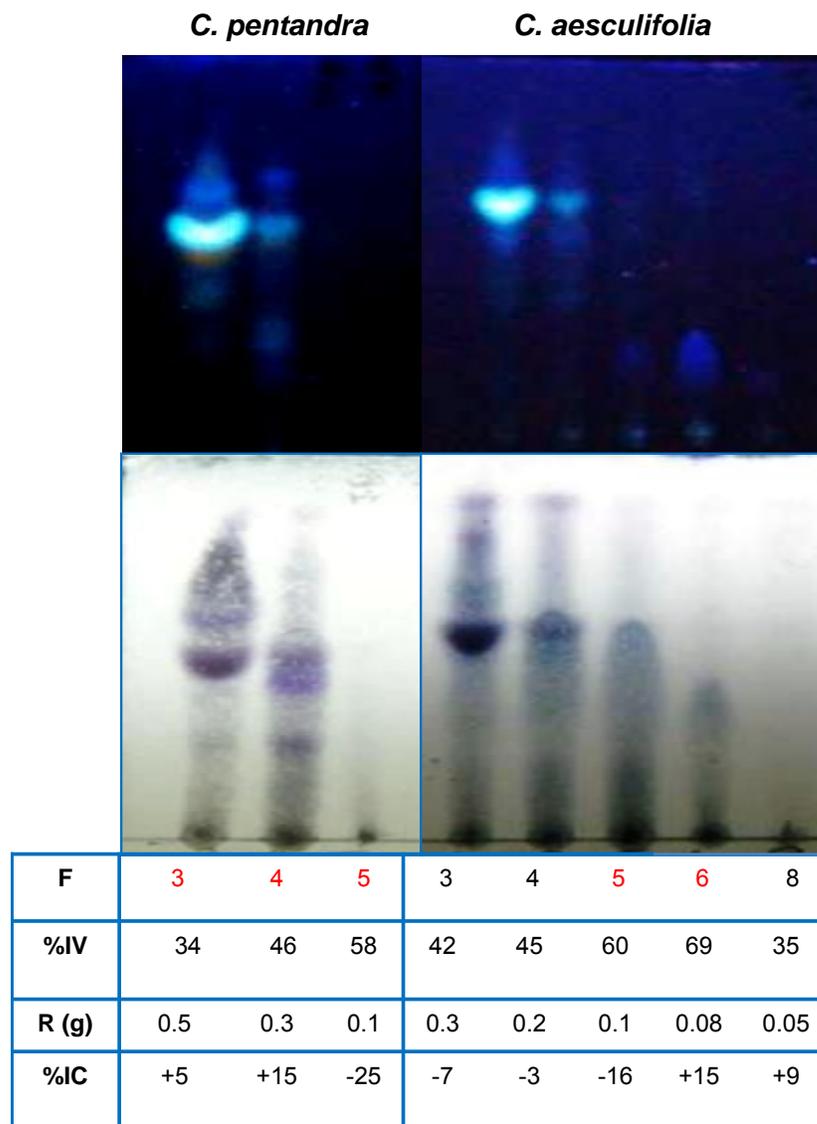


Figura 17. CCF de las fracciones activas obtenidas del extracto hexánico de *Ceiba pentandra* y *Ceiba aesculifolia*. A. Revelada con vainillina-ácido sulfúrico y B. UV 254nm. En cada una se muestra: F = número de fracción; %IV = porcentaje de inhibición de violaceína; R = rendimiento y %IC = porcentaje de inhibición del crecimiento. La placa se eluyó en un sistema 5:5 Hexano: Acetato de etilo.

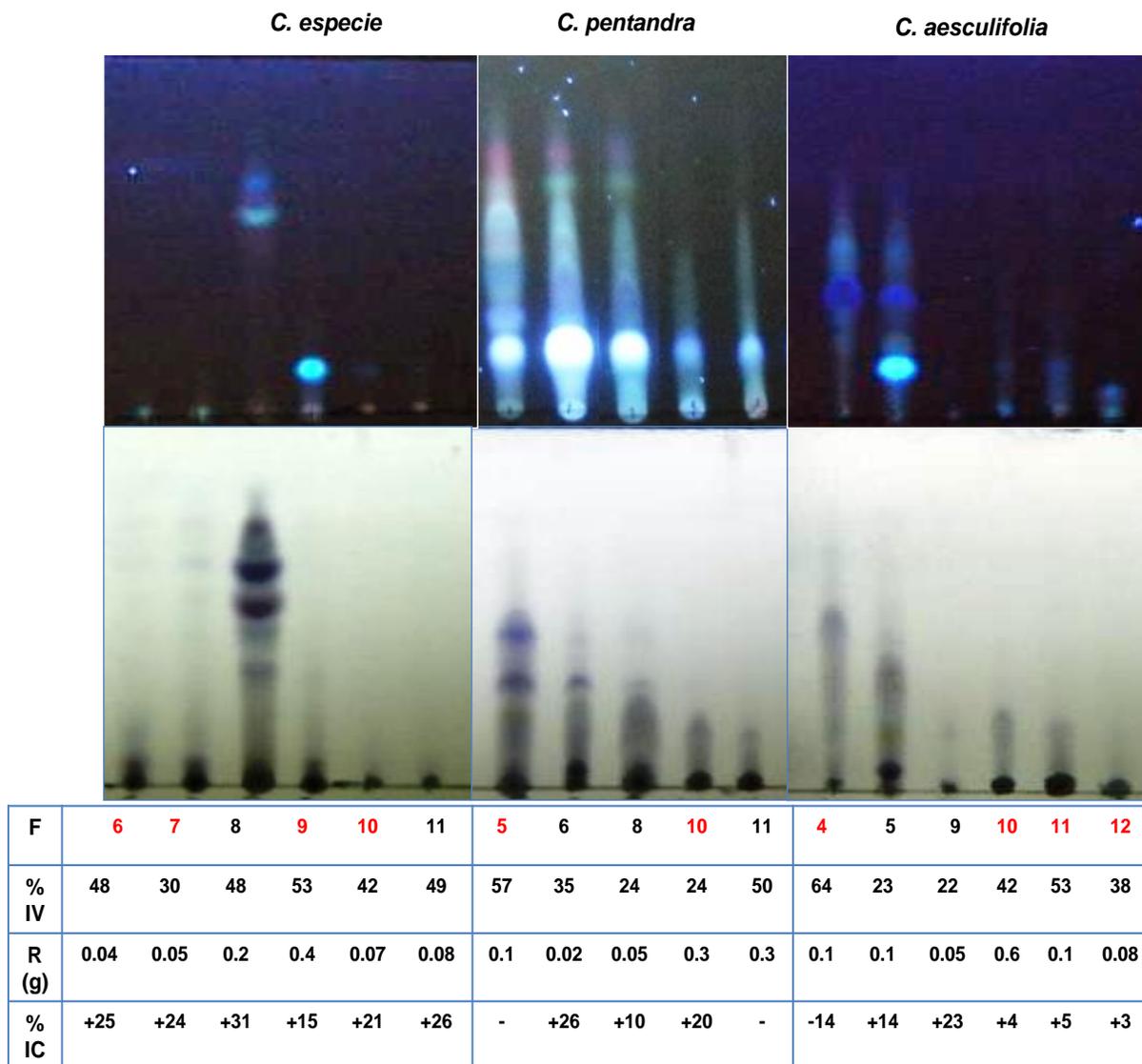


Figura 18. CCF de las fracciones activas obtenidas del extracto diclorometánico de las cortezas de *Ceiba*. A. Revelada con vainillina-ácido sulfúrico y B. UV 254 nm. En cada una se muestra: F = número de fracción; %IV = porcentaje de inhibición de violaceína; R = rendimiento y %IC = porcentaje de inhibición del crecimiento. La placa se eluyó en un sistema 5:5 Hexano: Acetato de etilo.

5.4. Descripción anatómica de la corteza.

A continuación se describe la anatomía de la corteza de *C. aesculifolia* y *C. pentandra*; se destacan algunas diferencias en el cuadro 1.

En sección transversal se distinguen tres zonas: floema no colapsado, floema colapsado y peridermis. Ritidoma solo se aprecia en las espinas, que varían en tamaño (Figuras 19A, 20A).

Floema. El floema no colapsado y colapsado están compuestos por elementos de tubo criboso (ETC), células acompañantes (CA), parénquima axial (PA) y parénquima radial (radios, R).

Floema no colapsado. Se organiza en estratos (PA/ETC/PA) que se interrumpen por los radios. Los grupos de ETC frecuentemente se observan comprimidos y a ambos lados. Los estratos de PA se componen de 2-3 hileras de células (Figuras 19B y 20B). En *C. pentandra* asociados con el parénquima y cercano al cámbium vascular, se distinguen paquetes de fibras formadas por 1-2 hileras de células con paredes engrosadas frecuentemente lignificadas (Figura 20B).

Los ETC presentan paredes delgadas y se alargan en sentido tangencial tomando una forma rectangular, se apilan radialmente formando paquetes compactos (Figura 20B), con $23 \pm 39 \mu\text{m}$ de diámetro tangencial y placas cribosas compuestas. Las CA se localizan en las paredes radiales de los ETC. Las células de parénquima son de forma redondeada. Los R, en esta zona son de curso rectilíneo a sinuoso; en *C. pentandra* tienden a dilatarse muy cerca del cámbium vascular (Figuras 19A, 20A).

Los R multiseriados tienen 6 a 8 células de ancho. Los cristales son de dos tipos: drusas y cristales prismáticos. Las drusas son abundantes en *C. aesculifolia* y escasas a regulares en *C. pentandra*; mientras que los cristales prismáticos son más numerosos en *C. pentandra*.

Floema colapsado. Se conserva el mismo arreglo que en el FNC; en ambas especies los estratos están de PA/ETC/PA se asocian con bandas de esclerénquima, 2-3 estratos de células de PA, 2-3 estratos de fibras d esclerénquima y ETC colapsado (Figuras 19C y 20C).

En *C. aesculifolia*, alejados del cambium vascular, los paquetes de fibras presentan mayor número de estratos haciéndose más evidentes (Figura 19C). Varias células de PA presentan lúmenes de color anaranjado y sus paredes están engrosadas; su número aumenta conforme se acercan a la corteza y muchas de ellas presentan contenidos densos de color rojo oscuro en el floema más cercano a la peridermis. Próximas a la peridermis otras células de PA se colapsan de la misma manera que los ETC. Los R siguen un curso sinuoso y se dilatan notoriamente en forma de embudo conforme se dirigen hacia la periferia, se conectan entre sí en sus partes más distantes formando un continuo hacia la peridermis (Figuras 19A y 20A).

En las porciones dilatadas de los radios se forman grupos de células pétreas que pueden organizarse en bandas angostas cortas por debajo del felógeno (Figura 19D); en cortezas más desarrolladas de *C. aesculifolia* estos grupos son pequeños y de forma más o menos redondeada, mientras que en *C. pentandra* tienen mayor tamaño y son alargados tangencialmente (Figura 20C). En estas zonas dilatadas de

los radios también se observan drusas pero en menor proporción que en las capas inferiores; estas drusas se organizan en hileras tangenciales cerca del felógeno llegando a ser muy abundantes.

Peridermis (Figuras 19A, E, 20A, D). Está formada por felodermis, felógeno y felema organizados en hileras radiales. El felógeno se arregla en una sola hilera de células comprimidas radialmente, con paredes delgadas. La felodermis está compuesta de 3 a 5 estratos de células, con paredes regularmente gruesas.

El felema se muestra en estratos formados por 2- 3 hileras de células hialinas y por 2-3 estratos de células con contenidos oscuros. Hacia la periferia y por encima de éste, la siguiente peridermis se forma por otros 2 a 3 estratos de células hialinas, con paredes delgadas, seguidas de numerosas hileras de células de felema, compactas y alargadas radialmente.

Esta organización felodermis/felógeno/felema con numerosos estratos de células de felema alargadas radialmente, se repite hasta más de cinco veces en la espina de *C. aesculifolia*; debido a esto, la espina en esta especie se observa estratificada (Figura 19A). A diferencia en *C. pentandra*, las espinas son más pequeñas y forman un tejido homogéneo compuesto de numerosas capas de células de felema alargadas radialmente (Figura 20A).

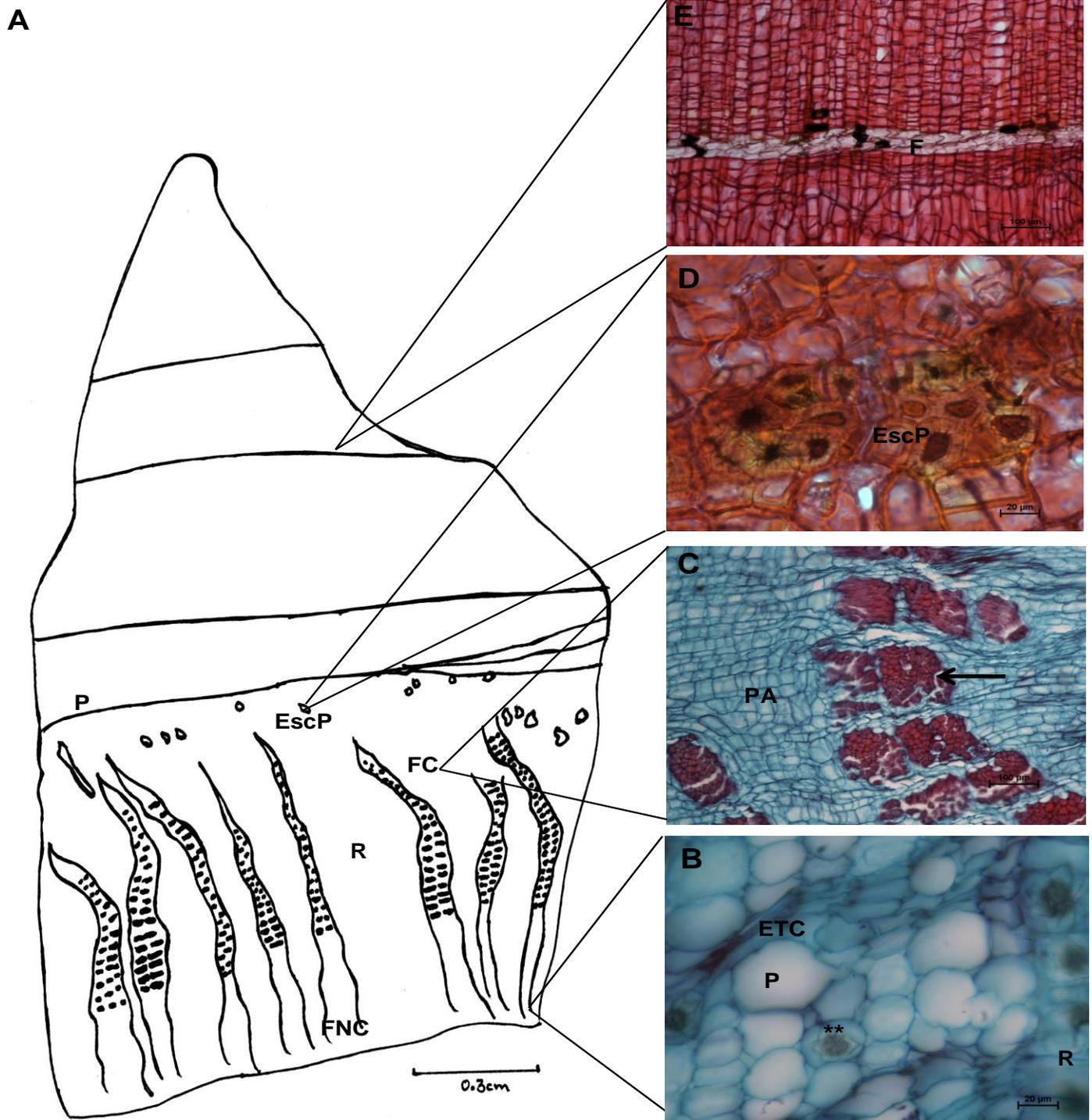


Figura 19. A) Vista general en corte transversal de la corteza de *Ceiba aesculifolia*. B) Zona de floema no colapsado, C) Zona de floema colapsado, D) Células pétreas cercanas a peridermis, E) Espina estratificada. En donde: FNC= floema no colapsado, FC= floema colapsado, R= radio, P= peridermis, ETC= elementos de tubo, EscP= células pétreas, PA= parénquima, →= fibras, F= felógeno, **= drusas.

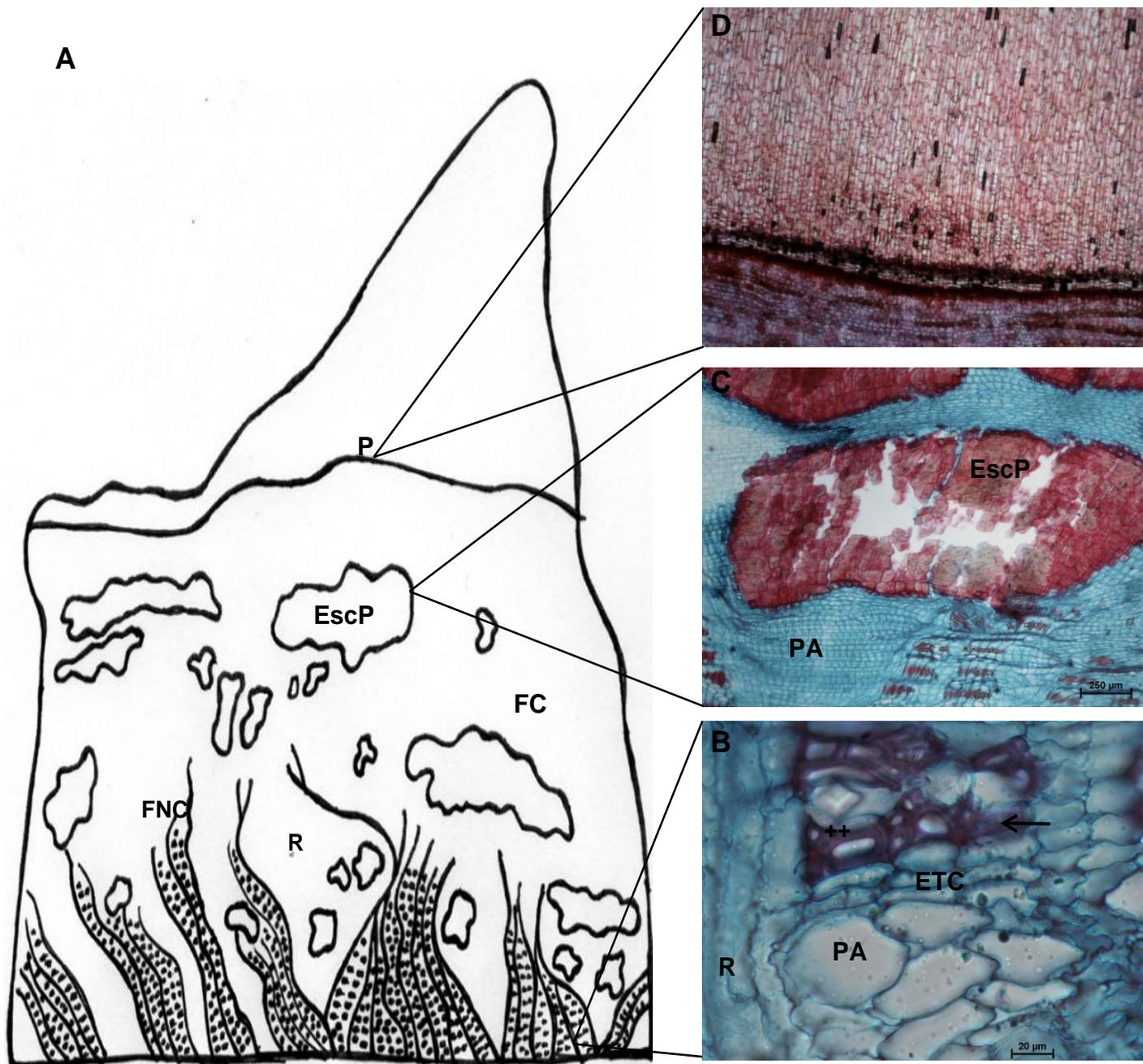


Figura 20. A) Vista general en corte transversal de la corteza de *Ceiba pentandra*. B) Zona de floema no colapsado, C) Grupo de células pétreas, D) Peridermis y base de la espina. En donde: FNC= floema no colapsado, FC= floema colapsado, R= radio, P= peridermis, ET= elementos de tubo criboso, EscP= células pétreas, PA= parénquima, \rightarrow = fibras, F= felógeno, ++= cristal prismático.

Las descripciones de *C. aesculifolia* y *C. pentandra* confirman que la corteza obtenida del comercio de plantas medicinales, realmente pertenece al género *Ceiba* sp. de la subfamilia Bombacoide. A continuación se muestran los caracteres que permitieron corroborar la identidad de esta corteza (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características anatómicas de las diferentes especies de *Ceiba* analizadas

Características	<i>C. aesculifolia</i>	<i>C. pentandra</i>	<i>Ceiba</i> sp.
Radios	Se dilatan cerca de la peridermis	Se dilatan cerca del cámbium vascular	Se dilatan cerca del cámbium vascular
Forma de los grupos de células pétreas	Redondeada	Alargada	Alargada
Posición células pétreas	Cercanos a peridermis	Cercanos a los radios floemáticos	Cercanos a los radios floemáticos
Grupos de fibras en folema no colpasado	Ausentes	Presentes	Presentes
Abundancia de drusas	Muy abundantes	Escasas a Regulares	Regulares
Abundancia de cristales prismáticos	Regulares	Abundantes	Abundantes

Características tales como la organización en estratos del floema, la dilatación de los radios en forma de embudo y la presencia de células pétreas en las porciones dilatadas de los radios (Roth, 1972) son los caracteres que más contribuyeron al reconocimiento del género de esta muestra.

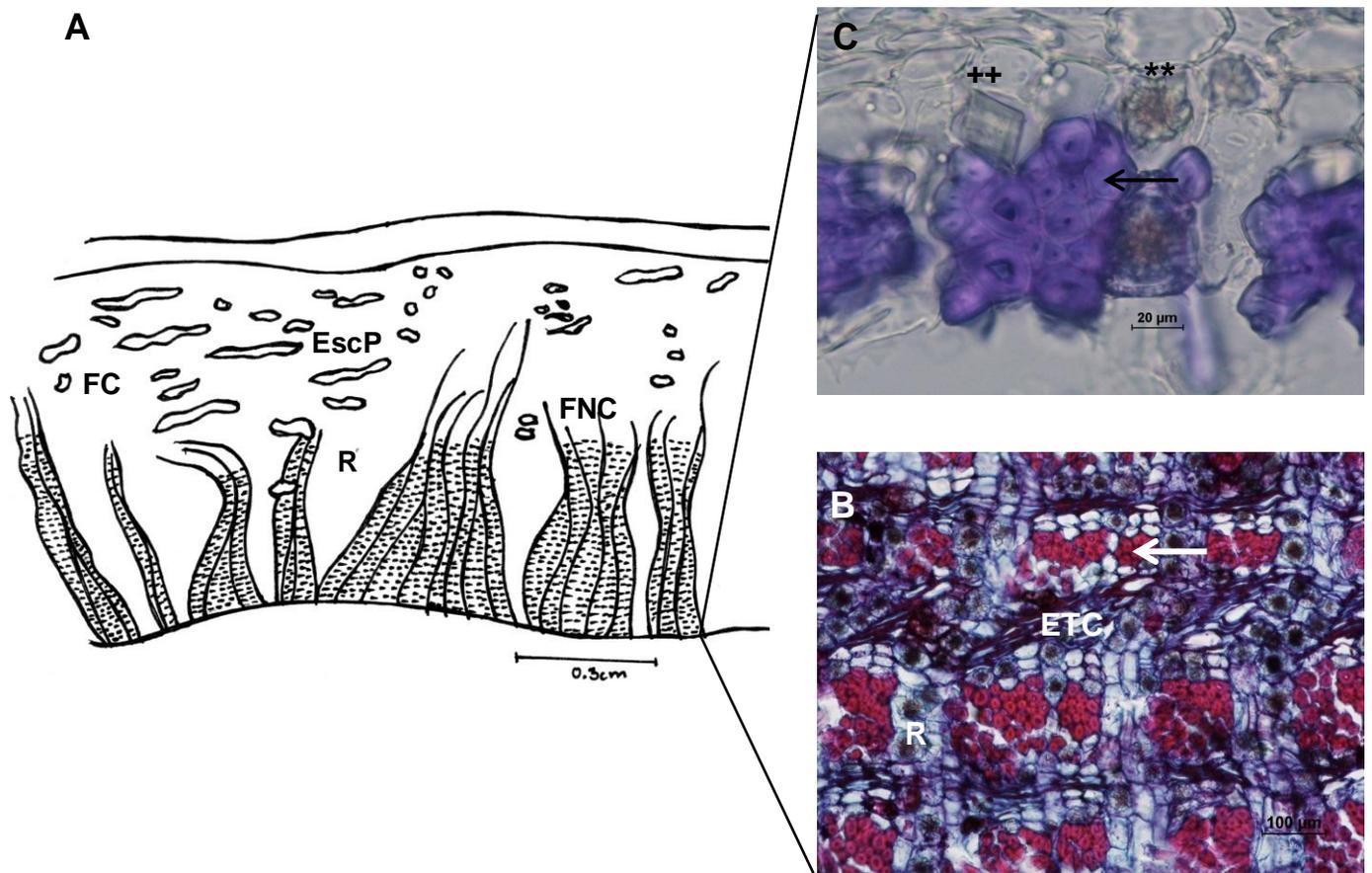


Figura 21. A) Vista general en corte transversal de la corteza de *Ceiba* sp. B y C) Floema no colapsado. En donde: EscP= Grupo de células pétreas; R= radio; FNC= floema no colapsado; **= Drusas; ++= cristal prismático; →= fibras.

Dichos atributos además, guardan un mayor parecido con aquellos de *C. pentandra* que con los de *C. aesculifolia* (Cuadro 1, Figura 21).

En general las características observadas en las cortezas de las Ceibas estudiadas concuerdan con lo descrito por Roth (1972) para *Ceiba pentandra*, sin embargo, aspectos como la presencia de drusas y cristales prismáticos (Figura 22) observados en los ejemplares estudiados aquí, difiere de lo mencionado por esta autora para la *C. pentandra*. De acuerdo a esta autora ningún tipo de cristal se encuentra presente en este grupo.

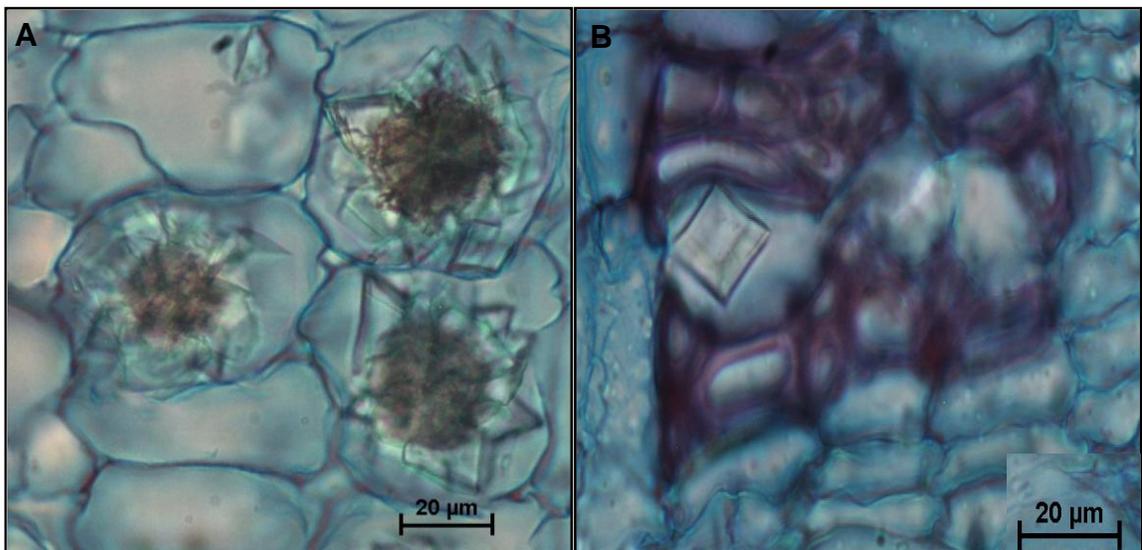


Figura 22. Cristales presentes en las diferentes cortezas de *Ceiba*. A= Drusas; B) Cristal prismático.

6. DISCUSIÓN

Actualmente, a nivel mundial varios laboratorios se han centrado en investigar la comunicación bacteriana, así como la relación que guarda, con los mecanismos que regulan la producción de factores de colonización y de daño. Se ha encontrado que el inhibir dicho proceso no afecta la viabilidad de las células bacterianas, pero sí interfiere en su capacidad de colonización y el daño que genera al huésped. Inhibir la comunicación bacteriana, apoya sistema inmune del hospedero para que elimine la infección.

Bajo esta idea, se ha empezado la búsqueda de nuevas fuentes de moléculas con la capacidad de inhibir la comunicación bacteriana o más específicamente los llamados SCQ, las cuales se plantean como la nueva generación de antimicrobianos, con capacidad de actuar incluso sobre cepas antibióticos-resistentes, y como potenciadoras de la actividad de los antibióticos.

Se ha señalado la presencia de metabolitos secundarios con actividad I-SCQ de especies vegetales de varios países (Vattem *et al.*, 2007; Adonizio *et al.*, 2008; Quave *et al.*, 2010; Szabo *et al.*, 2010; Zahin *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2011). En nuestro país no se había abordado la búsqueda de la actividad I-SCQ en especies vegetales que se distribuyen en nuestro territorio, de las cuales, muchas de ellas endémicas y de amplio uso por una parte de la población, para quienes el uso de plantas medicinales sigue siendo vigente.

En el caso de la corteza de *Amphipterygium adstringens* el antecedente derivó de un ensayo bioprospectivo realizado por nuestro grupo de investigación, en el que se encontró la actividad I-SCQ del extracto hexánico y de una mezcla de ácidos anacárdicos (Castillo-Juárez *et al*, 2013), sin embargo, no se había analizado con detalle la presencia de otros metabolitos con esta actividad dentro de la corteza.

El extracto hexánico de la corteza empleada de *A. adstringens* proveniente de un comercio de plantas medicinales, presentó un rendimiento acorde a la literatura, que es de aproximadamente 16 gr por kg de corteza seca y molida (Olivera, 1998; Rosas, 2005). Pero mediante el fraccionamiento en CC no fue posible obtener los principales compuestos con un grado de pureza y un rendimiento suficiente para los experimentos y pruebas de caracterización química. Se procedió a determinar la actividad I-SCQ de las fracciones del extracto hexánico y separar por medio de recristalización los terpenos del diclorometánico.

Con la recristalización fue posible obtener únicamente el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, el cual mostró tener una actividad I-SCQ empleando el modelo en *Chromobacterium violaceum*. El resultado obtenido está acorde con los obtenidos previamente para una serie de compuestos de la misma naturaleza por investigadores del grupo con el que colaboramos de la Facultad de Química de la UNAM y el Instituto Nacional de Cardiología (Becerril, 2013).

De las 10 fracciones finales obtenidas del extracto hexánico y con un rendimiento suficiente para los ensayos biológicos, se logró identificar cinco con

actividad I-SCQ. En ninguna de ellas se logró identificar los dos triterpenos o los ácidos anacárdicos en CC. Sin embargo, para el caso de las fracciones 1, 16 y 14 (Figura 6) no es clara la presencia de metabolitos bajo el sistema de elución y de revelado que se empleó. En las fracciones 7 y 11, destaca la naturaleza terpénica de algunos metabolitos mayoritarios ya que viran con el agente cromógeno vainillina-ácido sulfúrico. Para el caso de la 11 es más compleja, ya que una serie de compuestos presentan fluorescencia en UV.

Aunque se logró identificar la actividad I-SCQ en algunas fracciones, al igual que en uno de los triterpenos característicos de la corteza, el bajo contenido en general de metabolitos, hace que esta parte del estudio sea insuficiente para dar una conclusión de la existencia del número real de moléculas activas contenidas en la corteza de *A. adstringens*. Los resultados indican que no solo la corteza contiene a los ácidos anacárdicos y el ácido 3 α -hidroximasticadienónico como moléculas con actividad I-SCQ y es posible que el número pueda aumentar si se emplea un material fresco.

La baja cantidad y concentración de metabolitos en esta muestra, puede deberse a varios factores. El primero está relacionado con la colecta. En ocasiones se incorporan ramas u otras partes del árbol que no contienen los metabolitos o se mezcla con otras especies, se ha reportado que la corteza de *A. adstringens* se adultera con corteza de *Cytocarpa procera* (Rosas-Acevedo *et al.*, 2011). Es importante no solo determinar la presencia de los metabolitos indicadores, sino también cuantificar la concentración, así como identificar adulterantes de lo que se comercializa.

Otro factor está relacionado con el tiempo de almacenaje. La FEUM (2001) destaca que esta corteza se debe conservar a temperatura ambiente, en envases cerrados o costales protegidos de la luz y la humedad, lo cual no siempre ocurre.

Se identificó en el extracto hexánico y diclorometánico (excepto en el metanólico) una señal relativamente baja en CCF que correspondía a los ácidos anacárdicos, sin embargo, no fue posible aislarlos debido a que la mayor parte del metabolito pudo haber presentado un proceso de descomposición. Se ha reportado que en *Anacardium occidentale*, los ácidos anacárdicos, se descomponen debido al tiempo de almacenamiento y procesamiento (Tyman *et al.*, 1989).

Es importante corroborar los resultados encontrados en los ensayos *in vitro*, con estudios *in vivo*. De tal manera, que en este proyecto, se hizo un primer esfuerzo para implementar un modelo animal y determinar la actividad del extracto hexánico y los ácidos anacárdicos.

Este modelo sirvió para evaluar el efecto de los extractos y metabolitos aislados, sobre lesiones infectadas por la bacteria *P. aeruginosa*, el cual esta previamente avalado por diversos comités de ética en varios centros de investigación a nivel mundial (Bjarnsholt *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa graves problemas a nivel intrahospitalario, y es capaz de soportar dosis masivas de antimicrobianos, debido a su alta capacidad de generar mecanismo de resistencia (Martínez, 2007; Adonizio, 2008; de Kievitt, 2009). Además es una de las bacterias patógenas en donde más se han estudiado

los SCQ e identificado moléculas inhibidoras de estos sistemas (Pesci *et al.*, 1997; Venturi, 2006; Jimenez *et al.*, 2012).

P. aeruginosa presenta cuatro sistemas principales de censado de quórum, que regulan la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia, lo que la hace un sistema de estudio más complejo con respecto al de *C. violaceum*, en donde la producción de violaceína es controlada por un sistema de censado de quórum (McClellan *et al.*, 1997; Martinelli *et al.*, 2004, Adonizio *et al.*, 2006). Se decidió probar con este modelo animal y con la cepa *P. aeruginosa* PA14, debido a que es la misma cepa sobre la cual se reportó la actividad I-SCQ del extracto hexánico y de una mezcla de ácidos anacárdicos de *A. adstringens* por nuestro grupo de trabajo (Castillo-Juárez *et al.* 2013).

El mecanismo por el cual planteamos se elimina la infección en la dosis de más baja del extracto hexánico es por la I-SCQ, ya que los estudios *in vitro* señalan que este extracto no presenta un efecto antibiótico sobre esta cepa, pero si es capaz de atenuar la producción de factores de virulencia (Castillo-Juárez *et al.*, 2013). Hay que tomar en cuenta el efecto antiinflamatorio y cicatrizante reportado para los extractos de la corteza del *A. adstringens* y determinar su papel en el efecto de la disminución de las lesiones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

La combinación de actividades del extracto hexánico a esta dosis en particular parece ser beneficiosa, para aliviar este tipo de infecciones. Caso contrario, en la concentración más alta, el extracto favorece el establecimiento de *P. aeruginosa*, siendo significativamente mayor, que la presentada por los controles

tratados con aceite. Esto puede sugerir que el efecto anti-quórum del extracto hexánico está en función de la concentración de otras moléculas dentro del extracto con un efecto antagónico.

El efecto antagónico de estas moléculas consiste en enmascarar o eliminar el efecto anti-quórum al aumentar su concentración, a medida que se aumenta la del extracto en general. Evidencia de esto, puede ser el efecto presentado por las fracciones 8 y 13 del extracto hexánico de *A. adstringens* (Figura 7), fracción 7 del extracto hexánico junto con las fracciones 2 y 3 del diclorometánico de *C. aesculifolia* (figura 14), las cuales tienen un efecto estimulador del SCQ, ya que la producción de violaceína aumenta. Esto puede deberse a que al fraccionar el extracto, se aumenta la concentración de los metabolitos antagónicos.

Los resultados obtenidos muestran que es factible el uso del extracto hexánico para tratar y combatir lesiones producidas por daño térmico e infectadas con *P. aeruginosa*, si se controla la concentración de los tratamientos y se logra identificar los metabolitos que favorecen la estimulación de los SCQ.

El papel que juega el sistema inmune para que los metabolitos I-SCQ tengan un buen efecto, es muy importante. Se establece que la tasa de muerte aumenta en pacientes con quemaduras, principalmente por la presencia de cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes y es debida por la infección no controlada, más que por las lesiones mismas (Martínez, 2007; Adonizio, 2008). En el modelo animal empleado, la tasa de muerte es dependiente del tipo de cepa bacteriana, así como del estado general del sistema inmune de los animales. En nuestro caso, la cepa

PA14 produjo la muerte de uno de los tres animales controles, sin embargo, en los dos animales sobrevivientes en el doceavo día, el sistema inmune estaba contrarrestando la infección y todo indica que de seguir el experimento más días, los animales hubieran sobrevivido.

En los animales tratados con 55.3 mg/mL, se presentó el mismo índice de muerte, sin embargo la infección no se desarrolló y las lesiones se redujeron en un menor tiempo, con respecto a los tratados únicamente con el aceite de canola. La muerte de uno de los animales, pudo deberse a que presentaba un sistema inmune menos eficiente con respecto a los dos animales del grupo.

En la fracción rica en ácidos anacárdicos a una dosis mucho más alta que la de los extractos (500 mg/mL), se registró la muerte de todos los animales al tercer día de experimentación. Podemos argumentar que este resultado tan drástico, se debe a un efecto tóxico por parte de la fracción, sin embargo, para dar una mejor explicación a esto, se debió haber determinado si este efecto se repite en animales tratados con la quemadura, sin infección de *P. aeruginosa*.

Al tratarse de una fracción y a la dosis probada es factible que en esta mezcla, se presente el mismo efecto que con el extracto hexánico a 166 mg/mL, en donde la presencia de moléculas con efecto antagónico disminuyan el efecto I-SCQ y potencialicen la virulencia de la bacteria, provocando la muerte de los animales. Sin embargo, no se determinó la cantidad de *P. aeruginosa* en las lesiones o si la infección se diseminó a otros órganos y que fuera una infección sistémica la causante de la muerte de los animales.

Es importante repetir estos experimentos considerando los controles adecuados y en su caso, emplear metabolitos puros para evitar efectos no previstos y poder dar una interpretación de lo realmente que sucede dentro del sistema.

Otras cortezas en las que se investigó la actividad I-SCQ, son las de *C. aesculifolia* y *C. pentandra*, así como de una muestra proveniente de un comercio de plantas medicinales (*Ceiba sp.*) empleando el sistema de *C. violaceum*.

Se empleó el modelo de *C. violaceum* por ser un modelo sencillo que permite trabajar con un número considerable de muestras, sin embargo, muestra un inconveniente que consiste en la solubilización de la violaceína al medir en el espectrómetro.

Aunque en el pozo se puede observar una disminución en la producción de violaceína, el análisis estadístico en algunos casos no muestra una diferencia significativa con respecto al control. Esta variación se puede deber a que en otros protocolos la violaceína se extrae con acetato de etilo, donde tiene una buena solubilidad, sin embargo, para el caso de nuestro método se disuelve con DMSO y en ocasiones no se disolvía por completo u otras sustancias en el cultivo interferían con la medición. Estas variaciones se pudieron contrarrestar haciendo un análisis de las gráficas obtenidas y con la coincidencia con el respectivo análisis visual de las placas.

Los resultados obtenidos en este estudio, señalan que las dos especies de ceibas exhiben una actividad similar, en cuanto a la inhibición de la violaceína en *C. violaceum* wt, siendo más evidente en los extractos hexánicos y de diclorometano.

Para el caso del control positivo (mezcla de ácidos anacárdicos), la actividad anti-quórum fue constante, sin embargo, se registró una estimulación en el crecimiento en la cepa mutante de *C. violaceum* CVO26, de 20 al 30 %. Este fenómeno no se había reportado en experimentos ni trabajos previos del grupo de investigación, debido a que no se había utilizado la técnica de medir la producción de violaceína en la cepa wt y el crecimiento en la cepa mutante.

Como se había mencionado en la cepa mutante CV026, el bloqueo de la homoserinlactona sintasa, evita que se genere la molécula autoinductora, sin embargo mantiene la capacidad para censarla. Sugerimos que es factible que en los cultivos de esta cepa, incubados con ácidos anacárdicos con ésta cepa, éstos no actúen en el sitio de inhibición y la bacteria pueda usarlos como fuente de carbono o como algún factor de crecimiento específico. En los cultivos con la cepa silvestre (WT), que puede activar el SCQ (ya que tiene la maquinaria completa) los ácidos anacárdicos actúen inhibiendo el SCQ.

Los extractos hexánico y diclorometánico de *C. aesculifolia* y *C. pentandra* presentaron un rendimiento que permitió hacer un fraccionamiento por CC y probar la actividad I-SCQ tanto de los extractos como de las fracciones. A nivel de extracto, *C. pentandra* presentó una mejor actividad I-SCQ que *C. aesculifolia* (Figura 13A), al hacer el fraccionamiento esta tendencia se mantiene (Figuras 14A y 56A).

La CCF fina de los extractos muestra diferencias muy claras entre las dos especies, ya que en *C. pentandra* predominan los metabolitos de naturaleza terpénica al virar a color azul o magenta con el agente cromógeno vainillina-ácido sulfúrico, además presenta un metabolito mayoritario muy particular (Figura 12). En *C. aesculifolia* este metabolito no se presenta y se observan metabolitos de una naturaleza química diferente ya que se tornan de un color café (Figura 12). Estas diferencias pueden servir como marcador entre una especie y otra. Hasta el momento solo se había reportado la presencia de isoflavonas en el extracto etanólico de la corteza de *C. pentandra* (Noreen *et al.*, 1998) y fenoles en el extracto metánolico de *C. aesculifolia* (Orozco, 2010).

Las fracciones obtenidas también muestran diferencias, *C. pentandra* nuevamente presenta una mayor diversidad de metabolitos de naturaleza terpénica y en el caso de las fracciones 5, 6 y 8 del extracto diclorometánico la composición es más compleja ya que además muestra una serie de compuestos que presentan fluorescencia en UV (Figura 18).

El estudio anatómico de *C. aesculifolia* y *C. pentandra*, indica diferencias muy evidentes, la cuales parecen basarse en la posición, tamaño y/o forma de las células pétreas y la forma en que se dilatan los radios. Estos caracteres podrían ser tomados en cuenta para la separación entre especies al igual que las diferencias presentes en la CCF de los extractos (Figuras 19 y 20).

Los extractos de la muestra *Ceiba* comercial muestran una mayor similitud en su composición con *C. pentandra*, sobre todo en la presencia del metabolito secundario

mayoritario de naturaleza terpénica presente en ambas muestras (Figura 12). Sin embargo al fraccionar los extractos y evaluar la actividad I-SCQ estas semejanzas se pierden, solo fracciones del extracto diclorometánico presentan actividad y al hacer CCF no hay similitud de compuestos (Figuras 15 y 16). A nivel anatómico también presenta un mayor parecido con *C. pentandra* que con *C. aesculifolia* (Figura 21 y Cuadro 1).

Es posible distinguir entre las diferentes especies de este estudio en base a la anatomía y similitud en metabolitos. Así mismo, es necesario estudiar la anatomía de la corteza de otras especies del género que aporten información sobre la sistemática del grupo. Actualmente no se han registrado trabajos de las ceibas que se distribuyen en nuestro país. Según Roth (1972), los diferentes géneros de la subfamilia Bombacoide, presentan características muy parecidas entre sí, hecho que habría que confirmar o descartar.

Los extractos y fracciones que presentaron una mejor actividad I-SCQ en el modelo de *C. violaceum* fueron los de *C. pentandra*. La CCF indica que son moléculas de baja a mediana polaridad las que aportan esta actividad, como son los metabolitos de naturaleza terpénica y moléculas que presentaron fluorescencia a 254 nm que pueden ser de flavonoides o compuestos de naturaleza fenólica, de los cuales ya se tiene reportados su actividad I-SCQ (Castillo-Juárez *et al*, 2013; Cushnie y Lamb, 2011). En un modelo más complejo como lo es el de *P. aeruginosa*, las fracciones de *C. aesculifolia* fueron más efectivas al inhibir diferentes factores de virulencia.

7. CONCLUSIONES

- La corteza del *Amphipterigyum adstringens*, presenta diversos metabolitos con propiedades I-SCQ de naturaleza distinta a los ácidos anacárdicos.
- Se identificó uno de los principales compuestos presentes en la corteza del *A. adstringens*, el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, el cual inhibe la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum*, sin afectar su crecimiento.
- El extracto hexánico de la corteza del *A. adstringens* tiene un efecto positivo en la eliminación de la infección por *P. aeruginosa* y en la disminución de las lesiones, en el modelo de daño térmico en ratón.
- El extracto hexánico y una fracción enriquecida de ácidos anacárdicos obtenidos de la corteza del *A. adstringens* a dosis altas, tienen un efecto antagónico en la sobrevivencia de los animales, eliminación de la infección por *P. aeruginosa* y en la disminución de las lesiones.
- La corteza de *C. aesculifolia* y *C. pentandra*, presentan actividad I-SCQ en el sistema modelo de *C. violaceum*.
- Las fracciones con actividad I-SCQ de las cortezas de *C. aesculifolia* y *C. pentandra* muestran una diversidad de metabolitos distinta entre las dos especies.
- Existen diferencias anatómicas significativas, entre las cortezas de *C. aesculifolia* y *C. pentandra* lo cual permite su identificación, mediante el análisis histológico.
- La muestra de *Ceiba* proveniente del comercio comparte una composición similar de metabolitos y estructura anatómica con *C. pentandra*.

8. LITERATURA CITADA

- Adonizio, A.L. 2008. Anti-Quórum sensing agents from South Florida medicinal plants and their attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. Tesis Doctoral. Universidad Internacional de Florida. Miami, Florida.
- Adonizio, A.L., K. Downum, B.C. Bennett, and K. Mathee. 2006. Antiquórum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*. 105: 427–435.
- Aguilar-Rodríguez, S. y B.J. Castro-Plata. Anatomía de la madera de doce especies del bosque mesófilo de montaña del Estado de México. *Madera y Bosques* 12(1): 95-115.
- Alanís, A.D., F. Calzada, J.A. Cervantes, J. Torres, G.M. Ceballos. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 153- 157.
- Al-Hussaini, R., and A.M. Mahasneh. 2009. Microbial growth and quórum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules*. 14: 3425–3435.
- Al-Shuneigat, J, S., D. Cox, and J.L. Markham. 2005. Effects of a topical essential oil-containing formulation on bio-film-forming coagulase-negative staphylococci. *Letters in Applied Microbiology*. 41: 52–55.
- Argueta, A., L. Cano y M. Rodarte. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. Vol. 1, pp 58.
- Avendaño, A., A. Casas, P. Dávila y R. Lira. 2006. Use forms, management and commercialization of “pochote” *Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten y Baker f.

- subsp. *parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir (Bombacaceae) in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Journal of Arid Environments* 67: 15-35.
- Balaban, N., T. Goldkorn, Y. Gov, M. Hirshberg, N. Koyfman, and H.R. Matthews. 2001. Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating protein (TRAP). *The Journal of Biological Chemistry* 276:2658–67.
- Becerril, M.A. 2013. Inhibición de los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el censado de quorum utilizando *Verbescina persicifolia* y *Amphipterygium adstringens*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Bjarnsholt, T, M. van Gennip, H. Jakobsen, L. D. Christensen, P. Jensen, and M. Givskov. 2010. In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nature Protocols* 5(2): 282-293.
- Bjarnsholt, T., P.O. Jensen, M. Burmolle, M. Hentzer, J.A.J. Haagensen, H.P. Hougen. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leucocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* 151: 373-383.
- Blanch, R.A. 2010. *Biología Ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. Monográfico: La biotecnología en la economía del futuro. Nota d'economía* 97-98: 183-198.
- Boyás, D., F. Solares, J.M. Javelly, M.M. Linares y M. A. Cervantes. 1988. Diagnóstico forestal del Estado de Morelos. INIFAP-SAHR. Zacatepec. Morelos. Informe Técnico. p. 333.

- Brackman, G., T. Defoirdt, C. Miyamoto, P. Bossier, S. van Calenbergh, S.H. Nelis, and T. Coenye. 2008. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiology*. 8: 149–162.
- Brackman, G., U. Hillaert, S. van Calenbergh, H.J. Nelis, T. Coenye. 2009. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. *Research in Microbiology* 160: 144–151.
- Bravo, L., Y. Bermúdez y B. Montes. 2000. Inhibición de *Fusarium miniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Revista Manejo Integrado de Plagas* 57: 29-24.
- Bye, R., E. Linares, and E. Estrada. 1995. Biological diversity of medicinal plants in Mexico. *Recent Advances in Phytochemistry* 29:65-68.
- Calfee, M.W., J.P. Coleman, and E.C. Pesci. 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11633–11637.
- Canales, M., T. Hernández, J. Caballero, A. Romo de Vivar, G. Avila, A. Duran, and R. Lira. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 429-439.
- Castillo-Juárez I., R. García-Contreras, N. Velázquez-Guadarrama, R.M. Soto-Hernández, and M. Martínez-Vázquez. 2013. Anacardic acid from

Amphypterygium adstringens inhibits quórum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. Archives of Medical Research. Aceptado.

Castillo-Juárez, I., F- Rivero-Cruz, H. Celis, and I. Romero. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphypterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology 114:72-77.

Castillo-Juárez, I., R. García-Contreras, M. Martínez-Vázquez, N. Velázquez-Guadarrama y R.M. Soto-Hernández. 2012. Método de obtención de una mezcla de ácidos anacárdicos y su uso para atenuar la virulencia bacteriana. Número de solicitud: MX/E/2012/O85052. Expediente: MX/A/2012/813361.

Cha, C., P. Gao, Y.C. Chen, P.D. Shaw, and S.K. Farrand. 1998. Production of acylhomoserine lactone quórum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. Molecular Plant- Microbe Interactions. 11: 1119–1129.

Chan, K.G., C.S. Wong, W.F. Yin, C.K. Sam, and C.L. Koh. 2010. Rapid degradation of N-3-oxo-acylhomoserin lactones by *Bacillus cereus* isolated from Malaysian rainforest soil. Antonie Van Leeuwenhoek 98: 299-305.

Chevrot, R., R. Rosen, E. Haudecoeur, A. Cirou, B.J. Shelp, E. Ron *et al.* 2006. GABA controls the level of quórum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:7460–7464.

Choo, J. H., Y. Rukayadi, and J.K. Hwang. 2006. Inhibition of bacterial quórum sensing by vanilla extract. Letters in Applied Microbiology. 4: 637-641.

- Chowdhay, P.K., N. Keshvan, H.Q. Nguyen, J.A. Peterson, J.E. González, and D.C. Haines. 2007. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry* 46: 14429-14437.
- Cuevas F, X.M. 2004. A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). *Boletín Ibugana*. 13:27-47.
- Cushnie, T. and A.J. Lamb. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38: 99-107.
- de Kievit, T.R. 2009. Quórum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 11(2): 279-288.
- Dembitsky, V.A., A.A.A. Al Quntar and M. Srebnik M. 2011. Natural and synthetic small boroncontaining molecules as potential inhibitors of bacterial and fungal quórum sensing. *Chemical Reviews* 111:209–37.
- Dong, Y.H. and L.H. Zhang. 2005. Quórum sensing and quórum-quenching enzymes. *The Journal of Microbiology*. 43:101-109.
- FEUM. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2001. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, México.
- Fратиanni, F., R. Coppola, and F. Nazzaro. 2011. Phenolic composition and antimicrobial and antiquórum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar Annurca. *Journal of Medicinal Food*. 14: 957–963.
- Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg. 1994. Quórum sensing in bacteria: the LuxR–LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* .176: 269–275.

- Gao, M., M. Teplitski, J.B. Robinson, and W. D. Bauer. 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quórum sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(9): 827-834.
- Giacometti, A., O. Cirioni, Y. Gov, R. Ghiselli, M.S. Del Prete, and F. Mocchegiani. 2003. RNA III inhibiting peptide inhibits in vivo biofilm formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:1979–83.
- Girenavar, B., M.L. Cepeda, K.A. Soni, A. Vikram, P. Jesudhasan, G.K. Jayaprakash, and S.D. Pillai. 2008. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signalling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 204–208.
- Givskov, M., R. de Nys, M. Manefield, L. Gram, R. Maximilllen, L. Eberl, S. Molin, P. D. Steinberg, and S. Kjelleberg 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *Journal of Bacteriology* 178:6618-6622.
- Gómez-Castellanos, R. 2009. El ambiente regulatorio de los medicamentos herbolarios en México. Antecedentes, situación actual y perspectivas al año 2025. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas "BLACPMA"* 8:33-40.
- Hentzer, M. and M. Givskov. (2003). Pharmacological inhibition of quórum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation* 112: 1300- 1307.
- Hernández, T., M. Canales, J.G. Ávila, A. Duran, J. Caballero, A. Romo de Vivar, R, Lira. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in

- traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology* 88: 181-188.
- Hersch-Martínez, P. 1995. Commercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla, México. *Economic Botany* 49(2): 197-206.
- INI.1994. Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F.
- Jiménez, N., G. Koch, J.A. Thompson, K.B. Xavier, R. Cool, and W. J. Quaxb. 2012. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(1):46-65.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw- Hill Book Company. London
- Kaufmann, G. F., R. Sartorio, S.H. Lee, J.M. Mee, L.J. Altobell, D.P. Kujawa., et al. 2006. Antibody interference with N-acyl homoserine lactone-mediated bacterial quórum sensing. *Journal of the American Chemical Society* 128:2802–2803.
- Koh, K. H., and F. y. Tham. 2011. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quórum-sensing inhibitors activity. *Journal of Microbiology Immunology Infect* 44:144- 148.
- Martinelli, D., G. Grossman, U. Séquin, H. Brandl, and R. Bachofen. 2004. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quórum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BioMed Central Microbiology* 4:25.
- McClean, H.K., M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J.H. Lamb, S. Swift, B.W. Bycroft, S.A. Gordon, and A.B. Stewart. 1997. Quórum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violaceína

- production and inhibition for the detection of N- acylhomoserine lactones. *Microbiology*. 143: 3703-3711.
- McDougald, D., S.A. Rice, and S. Kjelleberg. 2007. Bacterial quórum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 87: 445-453.
- Midani, S. and M. Rathore. 1998. *Chromobacterium violaceum* infection. *Southern Medical Journal*. 91: 464–466.
- Miller, M. and B. L. Bassler. 2001. Quórum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 165-199.
- Miller, S.T., K.B. Xavier, S.R. Campagna. 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bactreial quórum-sensing signal AI-2. *Molecular Cell* 15 (5): 677-687.
- Mohan, A., S. Sagar, B. Priya and T. Bhagyashri. 2013. Phytochemical screening, flavonoid content and antioxidant activity of ethanolic extract of *Ceiba pentandra*. *International Research Journal of Pharmacy* 4:108-110.
- Navarrete, A., B. Ávila, V. C. Joshi, and X. Ji. 2006. Quantitative determination of triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by liquid chromatography and thin-layer chromatography and morphological analysis of cuachalalate preparations. *Journal of Association of Official Analytical Chemist International* 89: 1-7.
- Navarrete, A., L.S. Martínez-Uribe, and B. Reyes. 1998. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research* 12: 1-4.

- Navarrete, A., R. Mata and G. Delgado. 1989. Alkyl anacardic acids from *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. *Plant Medica*. 55- 57.
- Navarro, V., Ma. L. Villareal., G. Rojas., X. Lozoya. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 53:143-147.
- Navascués, O.C. 2006. Quórum Sensing en *Bradyrhizobium japonicum*: Identificación de genes implicados y detección y purificación de autoinductores. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.
- Nazzaro, F., F. Frattianni and R. Coppola. 2013. Quórum Sensing and Phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 12607-12619.
- Ng, W-L and B. L. Bassler. 2009. Bacterial Quórum Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics*. 43: 197-222.
- Ngounou, E.N., A.L. Meli and D. Lontsi. 2000. New isoflavone from *Ceiba pentandra* *Phytochemistry*. 54:107-110.
- Niembro R., A. 1990. Árboles y arbustos útiles de México naturales e introducidos. Limusa. México. pp. 33.
- Niu, C., S. Afre and E.S. Gilbert. 2006. Sub-inhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quórum sensing. *Letters in Applied Microbiology*. 43: 489–494.
- Noreen, Y., H. El- Seedi, P. Perera, and L. Bohlin. 1998. Two new isoflavones from *Ceiba pentandra* and their effect on cyclooxygenase –catalyzed prostandlandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*. 61: 8-12

- Noumi, E., F. Houngue, and D. Lontsi. 1999. Traditional medicines in primary health care: plants used for the treatment of hypertension in Bafia, Cameroon. *Fitoterapia*. 70:234-239.
- Novick, R.P and E. Geisinger. 2008. Quórum sensing in staphylococci. *The Annual Review of Genetics*. 42: 541-564.
- Ocegueda, S., M. E., y P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Biodiversitas* 62:12-15.
- Olivera, O. A.G., M. Soto, M. Martínez, T. Terrazas, and F. Solares. 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology*. 68:109-113.
- Olivera, O.A. 1998. Estudio fitoquímico del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Texcoco Estado de México. p.73.
- Olusola, L., I. Omekarah and M. Solomon. 2003. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 139-142.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.
- Orozco, M. J. 2010. Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *Juliana adstringens* y *Cyrtocarpa procera* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.

- Oviedo-Chávez, I., T. Ramírez-Apan, M. Soto-Hernández, and M. Martínez-Vázquez. 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11:436-445.
- Oviedo-Chávez, I., T. Ramírez-Apan, M. Soto-Hernández y M. Martínez-Vázquez. 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11: 436-445.
- Pagaza C, E.M., y R. Fernández.. 2004. La familia Bombacaceae en la Cuenca del río Balsas, México. *Polibotánica*. 17:71-102.
- Pan, J. and D. Ren. 2009. Quórum sensing inhibitors: a patent overview. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 19(11): 1-21.
- Park, S.Y., H.O. Kang, H.S. Jang, J.K. Lee, B.T. Koo, D.Y. Yum. 2005. Identification of extra-cellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quórum quenching. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2632-2641.
- Pennington, T. y J. Sarukhán. 1998. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. Segunda Edición. INIF.SAG, FAO, pp. 413.
- Quave, C. L., L. R. Plano, and B. C. Bennett. 2010. Quórum sensing inhibitors of *Staphylococcus aureus* from Italian medicinal plants. *Planta Medica* 77:188-95.
- Rasmussen, T.B and M. Givskov. 2006. Quórum-sensing inhibitors as antipathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 149-161.
- Rasmussen, T.B., M. Manefield, J. Andersen, L. Eberl, U. Anthoni, C. Christophersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2000. How *Delisea pulchra*

- furanones affect quórum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* 146: 3237-3244.
- Rasmussen, T.B., T. Bjarnsholt, M.E. Skindersoe, M. Hentzer, P. Kristoffersen, M. Köete, *et al.* 2005. Screening for quórum-sensing inhibitors (QSI) by use a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology* 187: 179-814.
- Reading, N. C. and V. Sperandio. 2006. Quórum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 254: 1–11.
- Rice, S. A., D. Mc Dougald, M. Givskov, and S. Kjelleberg. 2008. Detection and inhibition of bacterial cell-cell communication. *Methods Molecular Biology* 431:55-68.
- Richards, C. 1993. *Chromobacterium violaceum*, opportunistic pathogenic bacteria isolated in tropical and subtropical areas. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 86: 169–173.
- Riedel, K., M. Koth, B. Kramer, W. Saeb, A. Gotschlich, A. Ammendola, and L. Eber. 2006. Computer-aided design of agents that inhibit the *cep* quórum-sensing system of *Burkholderia cenocepacia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 318–323.
- Rivero-Cruz, I., L. Acevedo, J.A Guerrero, S. Martínez, R. Bye, R. Pereda-Miranda, S. Franzblau, B.N. Timmermann and R. Mata. 2005. Antimycobacterial agents from selected mexican medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 1117-1126.
- Rocha-Gracia, R. del C., M.M. Hernández, P.L. Zaráin, B.H. Carlos, H.S. Romero, E.C. Portugal, M.T.Z. Pérez, J.F. López- Olgúin. 2011. Antibacterial activity of crude

- extracts from Mexican plants against methicillin-resistant *Staphylococcus*. African Journal of Biotechnology 10(61): 13202-13218.
- Rosas, A.H. 2005. Estudio químico y biológico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 110 p.
- Rosas-Acevedo, H., T. Terrazas, M.E. González-Trujano, Y. Guzmán, and M. Marcos-Soto. 2011. Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats.
- Roth, I. 1972. Estructura anatómica de la corteza de algunas especies arbóreas venezolanas de *Bombacaceae*. Acta Botánica Venezuelica 7: 67-82.
- Rudrappa, T and H.P. Bais. 2008. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 1955–1962.
- Ruíz, M.L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia en antimicrobianos. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Rutherford, S.T. and B.L. Bassler. 2012. Bacterial Quórum Sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2:a012427
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México, DF. 432 pp.

- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y Orígenes de la Flora Fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14:3-21.
- Sarabhai, S., P. Sharma, and N. Capalash. 2013. Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. downregulate the expression of quórum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Plos One* 8: e53441.
- Sintim, H.O., J. Al Smith, J. Wang, S. Nakayama, and L. Yan. 2010. Parading shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quórum sensing , c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. *Future Medicinal Chemistry*. 2(6): 1005- 1035.
- Solares-Arenas, G., J. Jasso-Mata, J. Vargas-Hernández, R.M. Soto-Hernández y C. Rodríguez-Franco. 2006. Capacidad de regeneración y en grosor y lateral en corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht) en el estado de Morelos. *Ra Ximhai* 2(2): 481-495.
- Szabó, M. A., G. Z. Varga, J. Hohmann, Z. Schelz, E. Szegedi, L. Amaral, and J. Molnar. 2010. Inhibition of quórum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research* 24:782-6.
- Teplitski, M., J.B. Robinson, and W.C. Bauer. 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant- Microbe Interactions*. 13: 637–648.
- Teplitski, M., U. Mathesius, K.P. Rambaugh. 2011. Perception and degradation of *N*-acyl homoserine lactone quórum sensing signals by mammalian and plant cells. *Chemical Reviews* 111: 100-116.

- Trockenbrodt, H. 1990. Survey and discussion of the terminology used in bark anatomy. *International Association of Wood Anatomists Bulletin* 11: 141-166.
- Tyman, J.H.P., R.A. Johnson, M. Muir, and R. Rokhgar. The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the Cashew Nut (*Anacardium occidentale*). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 66: 553-557.
- Vandeputte, O.M., M. Kiendrebeogo, T. Rasamiravaka, C. Stévigny, P.Duez, S. Rajaonson, B. Diallo, A. Mol, M. Baucher, and M. El Jazir. 2011. The flavanone naringenin reduces the production of quórum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*. 157: 2120–2132.
- Vattem, D. A., K. Mihalik, S. H. Crixell, and R. J. McLean. 2007. Dietary phytochemicals as quórum sensing inhibitors. *Phytotherapy* 78:302-10.
- Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis Muñoz, M. I. Alcocer Silva, M. Gual Díaz y C. Sánchez Dirzo. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO - Instituto de Ecología, UNAM.
- Venturi, V. 2006. Regulation of quórum sensing in *Pseudomonas*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review* 30: 274–291
- Vikram, A., P.R. Jesudhasan, G.K. Jayaprakasha, B.S. Pillai, B.S. Patil. 2010. Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm. *International Journal of Food Microbiology* 140: 109–116.
- Villaseñor, J.L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 105-135.

- Walker, T.S., H.P. Bais, E. Deziel, H.P. Schweizer, L.G. Rahme, R. Fall, and J.M. Vivanco. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation and root exudation. *Plant Physiology*. 134: 320–331.
- Waters, C. M., and B. L. Bassler. 2005. Quórum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:319-46.
- Whitehead, N.A., M. Welch and G.P.C. Salmond. Silencing the majority. *Nature Biotechnology* 19: 735-736.
- Williams, P. and M. Cámara. 2009. Quórum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*. 12:182-191.
- Wilson, B.A., A. Salyers, D. Whitt, and M. Winkler. 2011. *Bacterial Pathogenesis, a molecular approach*. ASM PRESS Washington, DC; third edition; 292-307.
- Yeo, S-N.S. y F-Y. Tham. 2012. Anti-quórum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Malaysian Journal of Microbiology* 8(1): 11-20.
- Zahin, M., S. Hasan, F. Aqil, M. S. Khan, F. M. Husain, and I. Ahmad. 2010. Screening of certain medicinal plants from India for their anti-quórum sensing activity. *Indian Journal of Experimental Biology* 48:1219-24.
- Zhang, R.G., T. Pappas, J.L. Brace, P.C. Miller, T. Oulmassov, J.M. Molyneaux, *et al.* 2002. Structure of a bacterial quórum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 417: 971-974.