



## TÍTULO DE PATENTE No. 391053

**Titular(es):** UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NAYARIT

**Domicilio:** Ciudad de la Cultura Sin Número, Col. Centro, 63000, Tepic, Nayarit, MÉXICO

**Denominación:** EXTRACTO DE HOJAS DE SALPIANTHUS MACRODONTUS (GUAYABILLA) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

**Clasificación:** **CIP:** A61K36/185; A01K61/13; A61K41/00; A61P31/04  
**CPC:** A61K36/185; A01K61/13; A61K41/0028; A61P31/04; A61K2236/15; A61K2236/30; A61K2236/33; Y02P60/60

**Inventor(es):** PEDRO ULISES BAUTISTA ROSALES; ALEXEYEVICH JASSIEL PRADO MURGUÍA; PAOLA MAGALLÓN SERVÍN; JOSÉ ARMANDO ULLOA; FRANCISCO JAVIER MAGALLÓN BARAJAS; ROSALÍA SERVÍN VILLEGAS; RANFERI GUTIÉRREZ LEYVA

### SOLICITUD

<b>Número:</b>	<b>Fecha de Presentación:</b>	<b>Hora:</b>
MX/a/2017/015010	13 de Noviembre de 2017	10:05

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 13 de noviembre de 2037

**Fecha de Expedición:** 29 de marzo de 2022

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en [www.gob.mx/impi](http://www.gob.mx/impi).

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

### SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

#### EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:  
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION  
TRIBUTARIA|56||MX/2022/32406|MX/a/2017/015010|Título de patente normal|1220|RRGO|Pág(s)  
1||+PKlhZsq+/dKUULRoli+N4RJcl=

Sello Digital:  
GyQr6vngOVRdUkja4ijT7D/OWszZu4ycQstdsxiGLgN8ts4Y0BNlpscuoWcdYsKwgBGWajaMilCdhHATrxdpiVSIMP  
FsNIBAaG5f4TjwkjCovXbjspwc2MaJzJQO4USVqHvt8Gjc5KdTvTlbB4L8AUzLLuq2R9ulHJBRBJTAAZWayJslv2V  
BBRjnygl6ZnQlmHnK56NpB/o7Bm1ap/NsJmKAPwPICVf2peiTwe2vz8v6luqb82U/Yct0XLct7PJYldRssCpfCnJ  
Skz3RP0Uwxf/iynqe3Tefhasd5Fu0lQUd5xDQFBVvrNquS/LOfJgeKA8sxhHBw58YelUOBDQ==



MX/2022/32406



-1-

## EXTRACTO DE HOJAS DE *Salpianthus macrodontus* (GUAYABILLA) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La presente invención se encuadra en el campo técnico de la obtención de extractos de plantas para su uso en la inhibición del crecimiento de especies bacterianas, específicamente para la obtención de extractos estandarizados de la hoja de la planta mexicana conocida como “guayabilla” (*Salpianthus macrodontus*),  
10 concretamente para inhibir el crecimiento de especies bacterianas *Vibrio parahaemolyticus* y *V. harveyi*; y *Photobacterium damsela* y *P. leiognathi*.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención concierne a la utilización de un extracto obtenido de hojas de *Salpianthus macrodontus*, una planta que carece de estudios antibacterianos y que posee actividad antibacteriana contra bacterias de los géneros *Vibrio* spp. y *Photobacterium* spp. El extracto consiste en la extracción de los compuestos fitoquímicos de las hojas de *S. macrodontus* mediante el uso de acetona como  
20 solvente y ultrasonido de alta intensidad.

En la actualidad, enfermedades causadas por especies de los géneros *Vibrio* (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015) y *Photobacterium* (Rivas-Fontenla, 2012) han tenido un gran impacto a nivel mundial. Una de las enfermedades de mayor impacto con reportes  
25 de hasta 100% de mortalidad en cultivos de camarones es el llamado síndrome de mortalidad temprana (EMS) o enfermedad aguda de necrosis hepatopancreática (AHNPD) (Flegel, 2012; Leaño & Mohan, 2012; Lightner, 2012; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015), una enfermedad de origen bacteriano reportada por primera vez en China en 2009 y que se ha expandido a distintos países de Asia y América Latina, incluido  
30 México (Lightner, 2012; Tran *et al.*, 2013).

-2-

En México, este problema es comúnmente prevenido mediante la utilización de antibióticos comerciales como la oxitetraciclina, sarafloxacin, enrofloxacin, florfenicol, fosfomicina, monensina, salinomycin y semduramicina (NOM-EM-006-PESC-2004, 2004); sin embargo, su utilización ineficaz e insegura ha favorecido a la selección de bacterias resistentes a dichos antibióticos (Albuquerque Costa *et al.*, 2015). Aunado a esto, el uso de antibióticos en los sistemas marinos afecta negativamente el medio ambiente, poseen efectos sobre la biogeoquímica del sedimento marino y se acumulan en los tejidos de camarón alterando la flora intestinal, lo que puede provocar problemas de intoxicación o alergias en el consumidor final (Ma *et al.*, 2006).

Ante este hecho, los esfuerzos mundiales se han incrementado en la búsqueda de nuevas alternativas o búsqueda de compuestos bioactivos a través de la medicina tradicional mediante el uso de plantas consideradas medicinales (Valarmathy *et al.*, 2010), debido a que actuales estudios han demostrado su gran potencial antimicrobiano, además de que son más bioseguros, menos costosos, presentan menor generación de efectos secundarios y menor resistencia bacteriana que los antibióticos comerciales y drogas sintéticas (Abd El-Moez *et al.*, 2014).

En este aspecto, diversos extractos de origen vegetal se han estudiado contra bacterias que provocan enfermedades a varios organismos marinos, principalmente del género *Vibrio*, como son los diversos extractos de plantas usadas folclóricamente en la región central de la India [extractos etanólicos de *Syzygiumcumini* (jambul), *Lawsoniainermis* (alheña), *Terminaliabelerica* (bellaria) y *Magnífera indica* (mango), los extractos acuosos de *Alliumsativum* (ajo), *Azadirachtaindica* (neem), *Tamarindus indica* (tamarindo), *Punicagranatum* (granado), *Eugenia caryophyllus* (clavo de olor), *Mimusopselengi* (níspero) y *Pipernigrum* (pimienta común), así como los extractos acetónicos de *Saraca indica* (ashoka), *Datura stramonium* (estramonio), *Madhuca latifolia* (mahua), *Acacia catechu* (catechu) y *Acacia arabica* (goma arábica)], los cuales tuvieron actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* (2.5 – 20 mg mL<sup>-1</sup>)



-3-

(Sharma *et al.*, 2009). Asimismo, se determinó actividad inhibitoria del extracto etanólico y metanólico de hojas de *Azadirachta indica* (neem) contra bacterias patógenas aisladas de peces infectados, entre las que se encuentran *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (Dhayanithi *et al.*, 2010). De la misma manera, se determinó actividad antibacteriana del aceite esencial de 5 orégano con fracción alta en timol ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y otro con fracción alta en carvacrol ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) contra bacterias patógenas de camarón blanco (*Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Vibrio mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*) (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012).  
10 Igualmente, existen estudios sobre la actividad antibacteriana del extracto acuoso (obtenido con agua hervida durante 5 min) de hojas de guayaba contra *V. parahaemolyticus*, al igual que dos extractos acuosos (uno obtenido con agua hervida durante 5 min y otro mediante un baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche) de té verde y de un extracto metanólico al 90% de hojas de neem (Farjana *et al.*,  
15 2014), así como del jugo de las hojas de neem (3.13%) contra éste último patógeno (*V. parahaemolyticus*) (Banerjee *et al.*, 2013).

En el estado de la técnica se localizan diversos documentos de patentes de extractos con actividad antibacteriana como los siguientes:

20

El documento de patente US20150050372 A1 describe un producto farmacéutico que comprende un extracto producido por la extracción de las hojas de *Rhus copallina* con una mezcla de alcohol y agua.

25

El documento de patente US 8092843 B2 se refiere a un método para el tratamiento cutáneo de infecciones por *Herpes simplex* aplicando tópicamente al área del brote una composición que comprende al menos 1% en peso de extracto de hoja de olivo D-Lenolate®. También se describe una composición para el tratamiento, que contiene, en peso, al menos 1% de extracto de hoja de olivo D-Lenolate®, 1-3% de

30

neem, 0.05-1% de aloe y 0.05-1% de mentol.

-4-

El documento de patente WO2013183982 A1 describe composiciones para la desinfección y/o preservación efectiva de alimentos, por ejemplo alimentos frescos, lo que permite la eliminación efectiva de microorganismos en dichos alimentos. Las composiciones descritas contienen extractos derivados de plantas con actividad antimicrobiana, los cuales pueden actuar por si solos o en combinación con otros agentes desinfectantes, como por ejemplo ácidos orgánicos y compuestos de cloro. Las composiciones de la invención son capaces de eliminar contaminación microbiana, incluyendo de microorganismos patógenos, de semillas y de los germinados obtenidos a partir de las mismas sin alterar las propiedades de germinación de las semillas y las propiedades nutritivas y/o alimenticias de los germinados.

El documento de patente PCT/MX2013/000066 se refiere al desarrollo de composiciones que contienen fitoquímicos presentes en extractos de plantas que son utilizados como desinfectantes y conservadores para alimentos, por ejemplo de origen vegetal y animal; más particularmente a formulaciones acuosas a base de extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), el método mediante el cual se obtiene y sus usos como formulación efectiva para eliminar bacterias patógenas de alimentos, por ejemplo de semillas.

*Salpianthus macrodontus*, es una planta endémica y ampliamente distribuida en México (Hernández-Ledesma *et al.*, 2015), habita en suelos arenosos a lo largo de las orillas de arroyos o acantilados en los estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero y algunas zonas tropicales (Shreve & Wiggins, 1964). Es conocida vulgarmente según la región como: “catarinita”, “catarinilla” y “guayabilla” (Hernandez-Galicia *et al.*, 2002). Pertenece al género *Salpianthus* (familia *Nyctaginaceae*) que incluye sólo 4 especies de las cuales la especie *S. macrodontus* destaca por sus propiedades hipoglucemiantes (Marles & Farnsworth, 1995; Peesa, 2013), antifúngicas contra *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium expansum*, ambos hongos patógenos de granos de trigo y maíz (Tequida-Meneses *et al.*, 2002) y efectivo contra insectos de granos almacenados



-5-

(Tequida-Meneses *et al.*, 2005), así como para el gorgojo *Prostephanus truncatus* Horn en su forma inmadura (Tequida-Meneses *et al.*, 2005). Aunque el principal uso de *S. macrodontus* es como hipoglucemiante, en algunas regiones de Nayarit, México, es usada de manera folclórica para tratar enfermedades en cultivos agrícolas ocasionadas por diversos microorganismos y no existe información en la literatura científica sobre este tipo de actividad contra agentes infecciosos, por lo que se pretende proteger el extracto obtenido de las hojas de dicha planta debido a que posee actividad inhibitoria contra especies bacterianas de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* aisladas de un brote masivo de AHPND (Enfermedad Aguda Necrotizante del Hepatopáncreas, por sus siglas en inglés) en cultivos semi-intensivos de camarón blanco en el noreste de México.

#### OBJETO DE LA INVENCION

15 Un objeto de la presente invención es proponer un método de obtención y uso de un extracto de las hojas de *Salpianthus macrodontus*, conocido como “guayabilla”.

Otro objeto es proponer un extracto obtenido de hojas con actividad inhibitoria contra especies bacterianas de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*.

20

#### BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En la presente memoria de la invención, todos los términos científicos utilizados tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por uno de los expertos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualesquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de las *formulaciones* o dosis unitarias. A menos que se indique lo contrario, las técnicas empleadas o contempladas en la presente memoria son metodologías estándar. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no limitantes.

30

-6-

La presente invención se refiere concretamente a un método de obtención de un extracto de las hojas de *Salpianthus macrodontus*, conocida como “guayabilla”, “catarinita” o “catarinilla”, donde de manera preferente se utiliza acetona como solvente y ultrasonido de alta intensidad.

5

El método de la presente invención permite obtener extractos con efecto inhibitorio contra especies del género *Vibrio* y *Photobacterium* aisladas de un brote masivo de AHPND (Enfermedad Aguda Necrotizante del Hepatopáncreas, por sus siglas en inglés) en cultivos semi-intensivos de camarón blanco en el noreste de México. Los extractos pueden ser utilizados en el sector acuícola, microbiológico, farmacéutico, clínico y agroquímico.

10

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La figura 1 es una gráfica que muestra la actividad antibacteriana (en porcentaje de inhibición) del extracto acetónico de hojas de *Salpianthus macrodontus* (guayabilla) a diferentes concentraciones contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *Photobacterium leiognathi* y *P. damsela*.

20

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención refiere a un método de obtención y uso de un extracto de las hojas de *Salpianthus macrodontus*, conocido como “guayabilla”, utilizando acetona como solvente y ultrasonido de alta potencia, con efecto inhibitorio contra especies de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*.

25

El método de obtención de extractos de hojas de *Salpianthus macrodontus* de la invención, incluye las siguientes fases principales:

- I. Obtención del material vegetal seco
- 30 II. Obtención de los extractos en general
- III. Análisis de actividad antibacteriana en cepas de *Vibrio* y *Photobacterium*

-7-

De acuerdo al método de la invención, la obtención del material vegetal seco se realiza mediante el siguiente procedimiento:

- Recolección de las flores de guayabilla (*S. macrodontus*).
- 5 • Secar las hojas a la sombra.
- Moler hasta la obtención de un polvo fino.

Primeramente, se recolectan las hojas de guayabilla (*S. macrodontus*) y son secadas a la sombra para que, finalmente, se muelen hasta la obtención de un polvo fino mediante un molinillo de café y son guardadas en bolsas de cerradura hermética.

De esta manera se obtienen los extractos metanólicos (EM), acetónicos (EA) y hexánicos (EH) de las hojas de *A. indica* (EMN, EAN y EHN, respectivamente), usadas como controles, y de las hojas de *S. macrodontus* (EMH, EAH y EHH, respectivamente).

Posteriormente, el sobrenadante es recuperado mediante filtración al vacío a través de papel Whatman No. 1 y el solvente es eliminado en rotavapor a no más de 40°C bajo condiciones de vacío.

A continuación, los extractos deben ser resuspendidos en glicerol al 20% hasta alcanzar una concentración de 1 g mL<sup>-1</sup> y, consecutivamente, en caldo soya tripticaseína al 50% (TSB 50%) suplementada con 20 g/L de cloruro de sodio (TSB<sub>20</sub> 50%) hasta obtener una concentración final de 100 mg mL<sup>-1</sup> (solución stock). Finalmente, los extractos fueron esterilizados a través de filtros con poros de 0.22 µm y almacenados a -20 °C hasta sus posteriores análisis.

Para la evaluación del efecto inhibitorio de todos los extractos, se realizaron cuatro concentraciones (12.5 – 100 mg mL<sup>-1</sup>) de cada extracto y se expusieron contra



-8-

*Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *Photobacterium damsela* y *P. leiognathi*, mediante la técnica de microdilución en caldo dentro de microplacas de 96 pocillos.

Los resultados mostraron que los extractos de hojas de *S. macrodontus* posee actividad inhibitoria contra especies de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*, además de que la actividad es mayor a los extractos de *A. indica*, los cuales tienen diversos estudios de su poder antibacteriano. Sin embargo, el extracto acetónico de hojas de *S. macrodontus* muestra máxima inhibición aún a 50 mg mL<sup>-1</sup> contra *Vibrio parahaemolyticus* y *V. harveyi* y a 25 mg mL<sup>-1</sup> contra *Photobacterium damsela* y *P. leiognathi*.

El efecto del extracto acetónico de hojas de *Salpianthus macrodontus* tiene una diversidad de aplicaciones, por ejemplo, en el uso acuícola se incluyen los siguientes:

- Uso directo para el control microbiano en alimentos balanceados para camarón.
- Uso directo para el control microbiano en alimentos balanceados para peces.
- Uso directo en sinergia con ácidos orgánicos y otros fitoquímicos para alimentos balanceados de peces marinos, dulceacuícolas y para camarón.
- Elaboración de mezclas sinérgicas con ácidos orgánicos, tales como ácido butírico, propiónico, acético y nicotínico para el control microbiano de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Photobacterium damsela*.
- Elaboración de mezclas sinérgicas con ácidos orgánicos y antibióticos de uso acuícola como tetraciclina, oxytetraciclina, entre otros para alimentos balanceados de uso acuícola.
- Elaboración de mezclas sinérgicas con ácidos orgánicos y otros fitoquímicos (extractos de pimienta, romero, entre otras), así como biosurfactantes como sanitizantes en los laboratorios de producción larvaria de camarón y de peces.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un extracto de hojas de *Salpianthus macrodontus*, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
  - 5 i) obtener hojas de *Salpianthus macrodontus*;
  - ii) secar las hojas a la intemperie y bajo sombra;
  - iii) moler en un molinillo las hojas secas hasta obtener un polvo fino;
  - iv) mezclar el polvo fino con acetona en una porción de 1:10;
  - 10 v) sonicar la mezcla anterior a 47 kHz, a 130W, durante 30 min, a una temperatura no mayor a 40°C;
  - vi) filtrar al vacío la mezcla sonicada a través de un filtro papel Whatman No. 1, para recuperar el sobrenadante; y
  - vii) eliminar la acetona en un rotavapor bajo condiciones de vacío y a una  
15 temperatura no mayor a 40°C.
  
2. Un extracto con actividad bactericida, caracterizado porque es obtenido por el método de la reivindicación 1 y en donde dicho extracto es un extracto acetónico (EA) de hojas de *Salpianthus macrodontus*.  
20
  
3. El extracto de hojas *Salpianthus macrodontus* con actividad bactericida, de conformidad con la reivindicación 2, para usarse en el control de bacterias patógenas de animales acuícolas
  
- 25 4. El extracto de hojas *Salpianthus macrodontus* para usarse de conformidad con la reivindicación 3, en donde las bacterias patógenas de animales acuícolas son del género *Vibrio* spp. y *Photobacterium* spp.
  
5. El extracto de hojas *Salpianthus macrodontus* para usarse de conformidad con  
30 la reivindicación 4, en donde las bacterias patógenas de animales acuícolas



-10-

del género *Vibrio* spp. pertenecen a las especies: *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*.

5 6. El extracto de hojas *Salpianthus macrodontus* para usarse de conformidad con la reivindicación 4, donde las bacterias patógenas de animales acuícolas del género *Photobacterium* spp. pertenecen a las especies: *P. damsela* y *P. leiognathi*.

10 7. El extracto de hojas *Salpianthus macrodontus* para usarse de conformidad con las reivindicaciones 3 a 6, en donde la cantidad efectiva del extracto es de 12.5 a 100 mg/mL.

15 8. El extracto de *Salpianthus macrodontus* para usarse de conformidad con las reivindicaciones 3 a 7, en donde los animales acuícolas son camarón y peces.

20

25

30

-11-  
RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona a un extracto obtenido de hojas de la planta *Salpianthus macrodontus*, acetona como solvente y ultrasonido de alta potencia, que posee efecto inhibitorio contra especies potencialmente patógenas de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*, que afectan negativamente en la producción de cultivos marinos; y los extractos de hojas pueden ser utilizados en el sector acuícola, microbiológico, farmacéutico, clínico y agroquímico, por ejemplo en alimentos balanceados para camarón y peces principalmente.



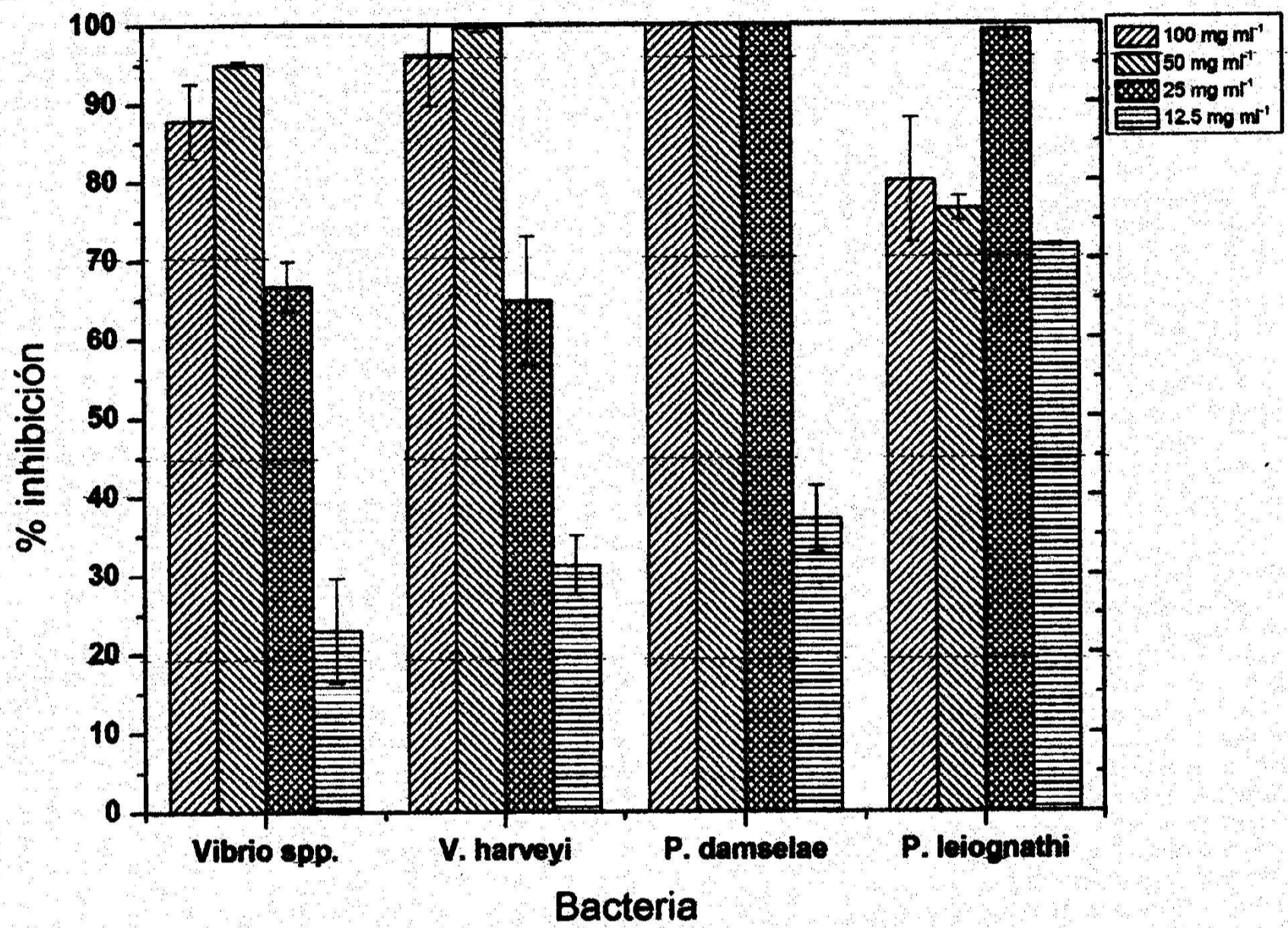


Figura 1