

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SEPARACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE METABOLITOS ACTIVOS DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA
TRADICIONAL MEXICANA

Por

Q. B. P. David Gilberto García Hernández

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Abril de 2016

ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SEPARACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE METABOLITOS ACTIVOS DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA
TRADICIONAL MEXICANA

Comité de Tesis

Dra. Catalina Rivas Morales

Presidente

Dra. María Adriana Núñez González

Secretario

Dra. Catalina Leos Rivas

Vocal

Dra. María Julia Verde Star

Vocal

Dr. Ramiro Quintanilla Licea

Vocal

Abril de 2016

ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SEPARACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE METABOLITOS ACTIVOS DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA
TRADICIONAL MEXICANA

Dirección de Tesis:

Dra. Catalina Rivas Morales

Director Interno

Dra. Elvira Garza González

Director Externo

Abril de 2016

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en particular a la Facultad de Ciencias Biológicas, por permitirme ser parte de su historia, gracias a los conocimientos adquiridos aquí y que a partir de hoy servirán para preparar a las futuras generaciones de profesionistas.

Al Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con la beca 377431 para el desarrollo de este trabajo.

“Todo lo que se hace por amor está más allá del bien y del mal”

F. Nietzsche

DEDICATORIA

Agradecido con Dios que me ha dado la oportunidad de llegar hasta éste logro académico, con su sabiduría y su protección.

A mis padres: Profesor Tomás Gilberto García Olvera y Ma. de Jesús Hernández Rodríguez que con su ejemplo de trabajo y perseverancia han hecho de mí lo que soy, de igual forma a mis hermanos Tomás Abdiel, Jesús Isahí García Hdz., Alejandro Álvarez Navarro y Roberto Rodríguez a quienes les dedico el esfuerzo de este trabajo, jamás se rindan, siempre hacia adelante.

A la Dra. Catalina Rivas Morales, amiga, compañera y guía en los momentos más importantes dentro de mi desempeño profesional, gracias por cada consejo y empujón para alcanzar este momento.

Al Comité de Tesis: Dra. María Julia Verde, Dra. Adriana Núñez González, Dra. Catalina Leos Rivas, Dra. Elvira Garza y Dr. Ramiro Quintanilla por la revisión de éste trabajo y sus acertados comentarios.

A mis compañeros de trabajo dentro del laboratorio, QBP. Raymundo Pérez, QBP. David Ortiz, Dr. Eduardo Sánchez, MC. Sergio García, Dr. Sergio Galindo, QBP. Brenda Armendáriz, QBP. Lily Velázquez, QBP. Janeth Rivas, MC. Lorena Lugo, MC. David Alejandro Hernández; quienes con su apoyo y carisma hicieron que cada día de trabajo la alegría y la dedicación se hicieran presente.

A mis amigos todos que con su actitud positiva, me llenan de alegría, en especial a Valeria Miranda, Branda Pedraza, Francisco de la Torre, Joel González, Jaziel Haro, gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

TÍTULO	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
MICROBIOLOGÍA	15
BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	18
ESTRÉS OXIDATIVO	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIÓN	70
PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72
RESUMEN BIOGRÁFICO	84
PUBLICACIÓN CIENTÍFICA	86
ANEXOS	92

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Taxonomía de <i>E. coli</i>	21
2	Taxonomía de <i>S. aureus</i>	22
3	Taxonomía de <i>P. aeruginosa</i>	23
4	Taxonomía de <i>K. pneumoniae</i>	23
5	Tabla 5. Taxonomía de <i>A. baumannii</i>	24
6	Taxonomía de <i>E. faecalis</i>	25
7	Plantas en estudio	31
8	Bacterias de importancia clínica en estudio.	32
9	Hongos dermatofitos en estudio.	32
10	Rendimiento de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.	39
11	Antibiograma para <i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44.	40
12	Plantas en estudio que mostraron actividad antibacteriana.	41
13	Actividad antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre el género <i>Trichophyton</i> .	42
14	Actividad antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre el género <i>Microsporum</i> .	42
15	Fracciones recolectadas en la separación por columna del extracto metanólico de Romero.	45
16	Señales características de grupos funcionales en el espectro infrarrojo del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.	51
17	Tabla de desplazamiento químico del ¹ H-RMN del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.	51
18	Desplazamientos químicos de ¹³ C-RMN del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.	52
19	Análisis de acoplamiento de HSQC del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.	53
20	Fracciones colectadas del extracto metanólico de semilla de apio.	54
21	Rangos de % de Inhibición del radical ABTS [•] de los extractos metanólicos.	60
22	Determinación de la IC ₅₀ para los extractos metanólicos.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Principales agentes del estrés oxidativo.	27
2	Antibiograma de <i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44.	40
3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de romero. Sistema: Benceno:acetona 9:1.	43
4	Bandas al UV y con revelador cloruro de cobalto, en el sistema benceno:hexano 9:1 del extracto metanólico de semilla de apio.	44
5	Bioautografías de los extractos de romero vs <i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44 y de semilla de apio vs especies de dermatofitos.	45
6	Ensayo de actividad antimicrobiana vs <i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44 de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de Romero.	46
7	Cromatografía en capa fina de las fracciones 3-9 del extracto de <i>R. officinalis</i>	47
8	Polvo amorfo blanquecino recuperado de la unión de las fracciones 4 y 5 del extracto metanólico de Romero.	47
9	Espectrograma de elución de la separación del polvo amorfo recuperado del extracto metanólico de romero.	48
10	Cromatografía en capa fina de los compuestos separados por Cromatografía Flash en el equipo ISOLERA Spektra.	49
11	Evaluación de la actividad bactericida de la partición metanólica del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.	49
12	Prueba de Lieberman-Buchard, para triterpenos	51
13	Cromatografía en capa fina de las fracciones (52 – 62) de la semilla de apio. Luz UV.	57
14	Cromatografía en capa fina de las fracciones (52 – 62) de la semilla de apio. Cloruro de Cobalto.	58
15	Actividad antifúngica de las fracciones 52 – 59 del extracto de semilla de apio	58
16	Curva de calibración de Trolox.	59
17	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	62
18	Concentración Mínima Fungicida	62
19	Comparación de los ácidos triterpénicos aislados del romero y sus principales diferencias.	67

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	TÍTULO	PÁGINA
1	Determinación de la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) de los extractos metanólicos.	61
2	Efecto inhibitorio de las dosis del compuesto 2 del extracto de romero frente a la línea celular Vero.	63
3	Efecto inhibitorio de las dosis del extracto metanólico de gobernadora frente a la línea celular Vero.	63
4	Efecto inhibitorio de las dosis del extracto metanólico de semilla de apio frente a la línea celular Vero.	64

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo / Abreviatura	Significado
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
Abs	Absorbancia
ABTS•+	Sal de diamonio 2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico]
CMF	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	Día(s)
DEPT	Distortion Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
h	Hora
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
mg	Miligramos
MHz	Mega Hercios
min	Minutos
mm	Milímetros
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-bromuro difeniltetrazolio
nm	Nanómetros
PBS	Buffer de fosfatos
ppm	Partes por millón
R _f	Relación de frentes
SFB	Suero fetal bovino
TLC	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
UA	Unidades de absorbancia
UV	Ultra Violeta

RESUMEN

Los microorganismos han incrementado significativamente la resistencia a los antibióticos debido a mutaciones en sus genomas, así como su uso indiscriminado; por tal motivo es vital la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades causadas por diversos agentes etiológicos y los daños producidos por estrés oxidativo de los mismos. En este trabajo seleccionamos 20 plantas de la medicina tradicional mexicana (*Apium graveolens* L; *Azadiratcha indica*.; *Castela texana*; *Equisetum robustum* A. Br; *Amphipterygium adstringens*; *Eucalyptus globulus*; *Larrea tridentata*; *Verbascum thapsus*; *Stevia rebaudiana*; *Foeniculum vulgare*, *Matricaria recutita*; *Carya illinoensis*; *Passiflora incarnata*; *Arctostaphylos pungens*; *Rosmarinus officinalis*; *Tilia platyphyllos*; *Valeriana ceratophylla*; *Cymbopogon citratus*; *Casimiroa edulis*, *Phalaris canariensis*); obtuvimos sus extractos metanólicos y evaluamos las siguientes actividades: a) Antibacteriana sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos de importancia clínica, b) Antifúngica sobre dermatofitos, ambas por el método de difusión en placa; c) Antioxidante por la capacidad de captación del radical ABTS^{•+} y d) Citotóxica sobre células normales de mamífero por el ensayo de MTT. Los extractos bioactivos, se fraccionaron por métodos cromatográficos, y fueron llevados a ensayos biodirigidos; se aislaron e identificaron por métodos espectroscópicos las moléculas responsables de mayor actividad. Resultados: 7 de los extractos poseen efecto antibacteriano frente a microorganismos resistentes a antibióticos; 13 también fueron activos sobre dermatofitos de importancia clínica. Aislamos e identificamos tres compuestos bioactivos: Del extracto de *R. officinalis* (romero): Ácido betulínico (CMI= 725 µg/mL vs *S. aureus* MRSA, no citotóxico); del extracto de semilla de *A. graveolens* (apio): 3-butilftalido y neocnidilido (CMI 1.4 mg/mL, citotóxicos); la actividad antioxidante fue mayor para los extractos de *L. tridentana* (gobernadora), *S. rebaudiana* (hierba dulce) y *C. illinoensis* (nogal) con una CI₅₀= 1.67, 2.68 y 2.70 µg/mL, respectivamente. Conclusión: Reportamos por primera vez actividad del extracto de *C. illinoensis* (nogal) vs *P aeruginosa* y de los extractos de *E. robustum* (cola de caballo), *S. rebaudiana* (hierba dulce) y *C. texana chaparro* (amargoso) vs *S. aureus* MRSA; así como la actividad sobre dermatofitos para los extractos de: *T. platyphyllos* (tila), *C. illinoensis* (nogal), *S. rebaudiana* (hierba dulce), *V. ceratophylla* (valeriana), *E. robustum* (cola de caballo) y *F. vulgare* (hinojo).

ABSTRACT

Microorganisms have significantly increased antibiotic resistance due to mutations in their genomes, and the indiscriminate use thereof ; for this reason it is vital the search for alternatives to control and/or treatment of diseases caused by various etiological agents and damage caused by oxidative stress thereof. In this work selected 20 plants used in traditional Mexican medicine (*Apium graveolens* L; *Azadiratcha indica*;; *Castela texana*; *Equisetum robustum* A. Br; *Amphipterygium adstringens*; *Eucalyptus globulus*; *Larrea tridentata*; *Verbascum thapsus*; *Stevia rebaudiana*; *Foeniculum vulgare*, *Matricaria recutita*; *Carya illinoensis*; *Passiflora incarnata*; *Arctostaphylos pungens*; *Rosmarinus officinalis*; *Tilia platyphyllos*; *Valeriana ceratophylla*; *Cymbopogon citratus*; *Casimiroa edulis*, *Phalaris canariensis*); from which we obtained their methanolic extracts and evaluate the following activities: a) Antibacterial on Gram positive and Gram negative microorganisms of clinical significance, b) Antifungal on dermatophytes, both by the plate diffusion method; c) Antioxidant capacity for uptake ABTS • + radical and d) Cytotoxic on normal mammalian cells by the MTT assay. Bioactive extracts were fractionated by chromatographic methods, and were carried to bio-targeted assays; they were isolated and identified by spectroscopic methods molecules responsible for increased activity. Results: 7 extracts have antibacterial effect against antibiotic-resistant microorganisms; 13 were also active against dermatophytes of clinical importance. We isolated and identified three bioactive compounds: the extract of *R. officinalis* (rosemary) betulinic acid (MIC = 725 µg/mL vs *S. aureus* MRSA, non-cytotoxic); seed extract of *A. graveolens* (celery): 3-butylphtalide and neocnidilide (MIC 1.4 mg/mL, cytotoxic); The antioxidant activity was higher for *L. tridentata* (creosote-bush) extracts, *S. rebaudiana* (sweet herb) and *C. illinoensis* (pecan nut) with an EC₅₀ = 1.67, 2.68 and 2.70 µg/mL, respectively. Conclusion: We report first activity of the extract of *C. illinoensis* (pecan nut) vs *P. aeruginosa* and *E. robustum* (horsetail), *S. rebaudiana* (sweet herb) and *C. texana* (Chaparro bush) extracts vs *S. aureus* MRSA. At the same time we are the first to demonstrate the activity for extracts: *T. platyphyllos* (linden), *C. illinoensis* (pecan nut), *S. rebaudiana* (sweet herb), *V. ceratophylla* (valerian), *E. robustum* (horsetail) and *F. vulgare* (fennel) on dermatophytes.

INTRODUCCIÓN

Por cientos de años, las plantas han constituido la base de los sistemas de medicina para mantener la salud e incrementar la calidad de vida. Las plantas acumulan sustancias o metabolitos secundarios que pueden ser extraídas y utilizadas como material para aplicaciones científicas, tecnológicas y comerciales, especialmente aquellos compuestos con actividad farmacológica considerados de importancia biológica e industrial (Hernández-Morales 2004).

La importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos, sino la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevos fármacos, los cuales no deben ser más tóxicos para los órganos del ser humano que para el microorganismo a tratar (Phillipson 1994).

Numerosas son las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello, se han empleado técnicas *in vitro* dada la sencillez y la reproducibilidad de las mismas (Hernández Díaz y Rodríguez Jorge 2001).

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas (Arencibia *et al.*, 2003).

La identificación de la o las moléculas biológicamente activas en los extractos de plantas nos conducen a la posibilidad de producir nuevos fármacos o a la modificación de estas moléculas para potenciar o frenar una función biológica.

ANTECEDENTES

I.- *Apium graveolens* (L) (Apio), familia Apiaceae, alt. Umbelliferae.

Partes utilizadas: parte aérea, frutos y a veces las raíces.

La parte aérea y raíces poseen esencia (limoneno, ácido sedanónico y ólico), manitol, apiona, sales minerales (calcio, fósforo, hierro), vitaminas B1, B2, C y K, caroteno, proteínas y glúcidos. Los frutos contienen 2-3% de esencia constituida por terpenos con pequeñas cantidades de anhidrico y lactonas del ácido sedanólico y fenoles. Cumarinas, furanocumarinas, colina, tirosina, glutamina, asparagina, apiona, oleonesina.



A. graveolens

La parte aérea y raíces son diuréticas, aumentando la eliminación de los productos tóxicos del metabolismo, aperitivos, eupépticos, carminativos, colagogos, antiasmáticos y remineralizantes. Los frutos también son digestivos, carminativos, diuréticos, tranquilizantes y anticonvulsivantes, estas dos últimas propiedades son debidas a su contenido en alcaloides.

Fueron aislados de la planta completa de apio (*A. graveolens*), tres nuevos diterpenoides y dos nuevos flavonoides (Zhou *et al.* 2009).

II.- *Azadirachta indica* (Neem), familia: Meliaceae.

Lo constituyen numerosos principios activos terpénicos: diterpenos y más de cincuenta tetranortriterpenoides: azadirachtina, nimbólido, ácido nimbidínico, azadirona, nimbina, entre otros.



A. indica

La corteza del Neem es fresca, amarga, astringente, se utiliza para tratar enfermedades de la boca, dentales, pérdida de apetito, fiebre, tos y parásitos intestinales. Sana heridas, ayuda en enfermedades de la piel y la sed excesiva. Las hojas ayudan para problemas neuromusculares, eliminar toxinas, purificar la sangre, también se utilizan para tratar las mordeduras de serpientes y de insectos. La fruta del Neem es amarga, se usa como purgante y para las hemorroides. Las flores son astringentes y expectorantes. De las semillas se extrae el aceite.

Ghimeray, Jin, Ghimire, & Cho, (2009) evaluaron la actividad antioxidante en hojas y corteza de *A. indica* utilizando metanol y hexano como solventes. La actividad antioxidante se determinó a través de la técnica DPPH encontrando resultados con diferentes magnitudes de potencia.

III.- *Castela texana* (Chaparro amargoso) familia Simaroubaceae.

La *C. texana* es un arbusto leñoso distribuido en las regiones áridas del noreste de México y en el sureste de Texas. Esta planta ha sido utilizada desde hace muchos años para tratar problemas de disentería amebiana en los humanos y recientemente, algunos extractos y compuestos aislados de ella han demostrado poseer actividad inhibitoria en cultivos *in vitro* de *E. histolytica* y de *Trichomonas vaginalis* (Calzado-Flores *et al.* 2002).



C. texana

Amarólido, chaparrinona, chaparrina, glaucarubolona, holacantona que se han aislado de esta planta y que cuentan con actividad antiprotozoaria y citotóxica. (Dou *et al.* 1996).

Es un arbusto tomado tradicionalmente en tés y cápsulas de la planta seca para el tratamiento de infecciones intestinales por amebas (Reyes-López *et al.* 2005).

IV.- *Equisetum robustum* A. Br (Cola de caballo), familia: Equisetaceae.

Se utiliza la Cola de Caballo (*E. robustum*) comúnmente para: infecciones de las vías urinarias y, eliminación de cálculos en los riñones, para activar la función de los riñones, gota; retención de líquido entre los tejidos; afecciones del estómago, menstruaciones excesivas, hemorroides sangrantes y vómitos de sangre por tuberculosis pulmonar. También se utiliza para combatir las hemorragias intestinales, rectales, vaginales y nasales.



E. robustum

En heridas.- se utilizan los tallos tiernos macerados y se aplican sobre las heridas, favoreciendo la cicatrización, es eficaz en las úlceras, deterativo, resolutivo y cáustico.

Fitoquímica

La *E. Arvense*, contiene alcaloides, incluyendo nicotina, palustrina y palustrinina. Flavonoides como la isoquercetina y equicetrina. Entre 5 y 10 % de ácido silícico. Sustancias diversas, incluyendo un equisitonino de la saponina, dimetil sulfona, tiaminasa y ácido aconítico.

V.- *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate), familia Anacardiaceae.

Cuachalalate es un árbol, de cuya corteza se han obtenido diversos productos utilizados en medicina tradicional; para la cicatrización, trastornos gastrointestinales (acidez, gastritis, úlcera péptica), disminución del colesterol sanguíneo así como en cáncer de estómago, entre otros (Hernández Guevara, *et al.* 1991).

De esta planta, se han aislado una mezcla de ácidos anacárdicos y tres triterpenos conocidos: ácido



A. adstringens

masticadienónico; ácido 3-alfa-hidroxi-masticadienónico; ácido 3-epi-oleanólico; así también como el esteroide beta-sitosterol (Castillo-Juárez *et al.* 2007).

VI.- *Eucalyptus globulus* (Eucalipto), familia: Myrtaceae.

Se utilizan las hojas de las ramas viejas. Su acción, es debida fundamentalmente al aceite esencial, es: antiséptico de vías respiratorias y urinarias, expectorante y balsámico, vermífugo, antibiótico, antifúngico y antiinflamatorio.



E. globulus

Dentro de su composición química destaca su contenido en aceite esencial, cuyo principal constituyente es el cineol o eucaliptol. Contiene también: terpineol, carburos terpénicos (alfapineno), alcoholes alifáticos y sesquiterpénicos (eudesmol), aldehidos (butírico, valerianico, caprónico) y cetonas.

Posee además taninos, pigmentos flavónicos (heterósidos del quercetol) y un heterósido fenólico complejo, el caliptósido, ácidos fenólicos (gálico, caféico), resina y un principio amargo (Taboas-Guimerans 2005).

Un nuevo compuesto cariostático llamado eucaliptona fue aislado de las hojas de *E. globulus*, su estructura se elucidó por métodos espectroscópicos (Osawa *et al.* 1995).

Eucaglobulino, un nuevo complejo de galotanino y monoterpene fueron aislados de las hojas de *E. globulus*, su estructura fue identificada en la base de datos espectrales (Hou *et al.* 2000).

Gutiérrez y Del Río, (2001) Demostraron la presencia de esteril glucósidos en *E. globulus* por medio de cromatografía de gases con espectro de masas.

El eucaliptol se mostró como el componente del aceite esencial de *E. globulus*, más abundante por el método de cromatografía de gases con espectro de masas (Tohidpour *et al.* 2010).

VII.- *Larrea tridentata* (Gobernadora), familia: Zygophyllaceae.

L. tridentata, es usada en el tratamiento de varias enfermedades incluidas la infertilidad, reumatismo, artritis, diabetes, litiasis renal y vesicular, dolor e inflamación. Recientemente se ha utilizado en el norte de México y el suroeste de los Estados Unidos como suplemento alimenticio, debido a la presencia del potente antioxidante ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) (Arteaga *et al.* 2005).



L. tridentata

Fueron aislados de las hojas de *L. tridentata*, tres lignanos, (7S,8S,7'S,8'S)-3,3',4'-trihidroxi-4-metoxi-7,7'-epoxilignano, meso-(rel 7S,8S,7'R,8'R)-3,4,3',4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignano y (E)-4,4'-dihidroxi-7,7'-dioxolign-8(8')-eno, sus estructuras fueron determinados primeramente por análisis espectroscópicos; su actividad antioxidante contra especies reactivas de oxígeno intracelular fue evaluado en células HL-60 (Abou-Gazar *et al.* 2004).

Fueron aislados de las flores esta planta por primera vez seis lignanos, incluido el ciclolignano 3,4'-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano, y la flavona, (S)-4',5'-dihidroxi-7-metoxiflavanona, en estos compuestos se evaluó la actividad inhibitoria de crecimiento de las líneas celulares de cáncer de mama, de colon y melanoma (Lambert *et al.* 2005).

VIII.- *Verbascum thapsus* (Gordolobo), familia: Scrophulariaceae.

Es una planta medicinal que ha sido utilizada para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, asma, tos espasmódica, diarrea u otras afecciones pulmonares ((Turker y Camper 2002).



Contiene abundante mucílago con propiedades suavizantes y emolientes, muy útiles para irritaciones del aparato digestivo, la piel o aparato respiratorio.

Contiene saponinas, de acción expectorante y fluidificante de las secreciones bronquiales.

V. thapsus

Es útil en irritaciones digestivas y respiratorias (bronquitis, asma, anginas, tos, traqueitis, etc), en hemorroides, úlceras varicosas, llagas, maduración de granos, etc. Se ha empleado en enuresis nocturna y diarreas (Taboas-Guimerans 2005).

Se han detectaron flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides, glicósidos, entre otros metabolitos primarios con actividad relajante y antihelmíntica (Ali *et al.* 2012).

IX.- *Stevia rebaudiana* (Hierba dulce), familia: Asteraceae, alt. Compositae.

Los usos farmacéuticos y nutracéuticos son: antioxidante natural, en personas diabéticas (no dependientes de la insulina), disminuye los niveles de glucosa en la sangre; en el tratamiento de la obesidad, reduce la ansiedad por la comida y el deseo de ingerir dulces o grasas; diurético suave (ayuda a bajar los niveles de ácido úrico); beneficioso para personas con hipertensión; combate la fatiga y la depresión; mejora las funciones gastrointestinales; mejora la resistencia frente a resfriados y gripes; para el tratamiento de quemaduras, heridas, eczemas, seborrea, psoriasis, dermatitis (Tigrero y Landázuri 2009).



S. rebaudiana

Se ha encontrado rebaudiosido A, un endulzante natural de *S. rebaudiana* en la cual cuatro unidades de beta-D-glucopiranososa son ligados a la aglicona (Steinmetz y Lin 2009).

S. rebaudiana tiene componentes con un potencial significativo para utilizarse como un agente antioxidante natural (Shukla *et al.* 2009).

X.- *Foeniculum vulgare* Mill (Hinojo), familia: Apiaceae, alt. Umbelliferae.

Hinojo (*F. vulgare*) es una umbrelífera perenne ampliamente distribuida, tradicionalmente utilizada para propósitos medicinales. Es ampliamente recomendada para tratar la diabetes, bronquitis, tos severa, y para el tratamiento de cálculos renales; algunas de estas enfermedades crónicas están relacionadas con la producción de especies radicales relacionadas con el estrés oxidativo. Sin embargo, el potencial antioxidante de esta planta solo es empírico (Barros *et al.* 2009).



F. vulgare

Los compuestos identificados más importantes de los aceites volátiles de hinojo fueron trans-anetol, estragol, fenchona, limoneno, alfa-pineno y gamma-terpineno (Aprotosoai *et al.* 2008).

Los principales componentes de los aceites esenciales aislados de las partes aéreas de *F. vulgare* fueron: trans-anetol (31-36%), alfa-pineno (14-20%) y limoneno (11-13%) y se les determinó la actividad antioxidante en los aceites de la planta con el método de DPPH y esta fue mayor en las frutas, además los aceites esenciales de hinojo mostraron una actividad pro-oxidativa a concentraciones más altas con el método TBARS. Los aceites esenciales mostraron una actividad antimicrobiana muy baja (Miguel *et al.* 2010).

XI.- *Matricaria recutita* (Manzanilla), familia: Asteraceae alt. Compositae.

En la preparación de té que se emplea contra malestares estomacales. Se utiliza con fines ceremoniales y religiosos, también tiene un uso veterinario además del medicinal (CONABIO 2009).



Los componentes principales del aceite esencial extraído de las flores son terpenoides alfa-bisabolol y óxidos y azulenos, incluido el chamazuleno (McKay y Blumberg 2006).

En el extracto de manzanilla se han identificado 11 compuestos fenólicos bioactivos, coumarinas: herniarina, umbeliferona; fenilpropanoides: ácido clorogénico, ácido cafeico; flavonas: apigenina, apigenin-7-O-glucosido, luteolina, luteolin-7-O-glucosido; flavonoles: quercetina, rutina, flavanona: naringenina (Fonseca *et al.* 2007).

XII.- *Carya illinoensis* (Nogal), familia: Juglandaceae.

Es el más importante productor nativo de «nueces» de Norteamérica (CONABIO 2009). También se ha reportado que los ácidos fenólicos y las proantocianidinas (PACS) de *C. illinoensis* poseen actividad biológica en enfermedades crónicas (Robbins *et al.* 2014). Además la semilla de la nuez contiene compuestos como ácido elálgico, ácido gálico, ácido protocatequico, ácido p-hidroxibenzoico y catequina (De La Rosa *et al.* 2011).



C. illinoensis

XIII.- *Passiflora incarnata* (Pasiflora), familia: Passifloraceae.

P. incarnata es una especie muy empleada en la terapéutica alopática desde hace muchos años y en la homeopatía, principalmente en el tratamiento del insomnio, también se utiliza como antiespasmódico, en el tratamiento de la adicción a drogas como la morfina, convulsiones en niños y neuralgias. (García *et al.* 2003).



P. incarnata

El extracto etanólico atrapa los radicales libres con mayor eficiencia que el extracto acuoso demostrando su actividad antiradical (Masteikova *et al.* 2008).

Fueron aislados e identificados de *P. incarnata*, cuatro principales flavonoides C-glicosídicos como schaftosido, isoschaftosido, isovetexin-2"-O-glucopiranosido e isoorientin-2"-O-glucopiranosido (Qimin *et al.* 1991).

XIV.- *Arctostaphylos pungens* (Pingüica), familia: Ericaceae.

En la medicina tradicional mexicana en los estados de México, Hidalgo y Sonora, la pingüica se recomienda principalmente para el tratamiento de las afecciones renales, se utiliza en infusión, la hoja, raíz o toda la planta, endulzada y tomada en ayunas (UNAM 2009).



A. pungens

Para controlar la fiebre, se ingiere la infusión de la planta o se dan baños con el cocimiento de las ramas con hojas, jabón neutro y leche. También se recomienda su uso en el tratamiento de: diarrea, dolor de estómago, tos, gonorrea, leucorrea, prostatitis, reumatismo, hidropesía e inflamación.

Se han identificado compuestos derivados glicosilados de la mircetina y quercetina (Panusa *et al.* 2014) los cuales han sido reportados con actividad antioxidante (Villa-Ruano *et al.* 2013).

XV.- *Rosmarinus officinalis* (Romero), familia: Lamiaceae , alt. Labiatae.

Es una planta muy rica en principios activos y ejerce acción sobre casi todos los órganos. Su contenido en aceite esencial (pineno, canfeno, cineol, borneol, alcanfor), le confiere una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón. Además es colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético, emenagogo y antigonadotrópico.



R. officinalis

Posee también flavonoides (apigenina, luteolina, glucósidos de genkwanol), ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, rosmarínico), principio amargo (picosalvia o carnosol). En uso externo es antineurálgico, antirreumático, cicatrizante y estimulante del cuero cabelludo. Indicado en casos de agotamiento nervioso, astenia, convalecencias, alteraciones digestivas y hepáticas, reumatismo, gota, cefaleas (Taboas-Guimerans 2005).

El aceite esencial de *R. officinalis* fue separado en las fracciones hidrocarbonada y oxigenada. El compuesto principal de la fracción hidrocarbonada fue el alfa-pineno (44.2%) camfeno (24.5%) y limomeno (11.7%), mientras que en la fracción oxigenada fueron 1,8-cineol (37.6%), camfor (16.5%) y acetato de bornilo (21.4%) (Costa *et al.* 2011).

XVI.- *Tilia platyphyllos* (Tila), familia: Malvaceae.

Dentro de sus propiedades medicinales tenemos: antiespasmódico, sedante, antirreumático, aperitivo, diurético, hipotensor suave, vasodilatador, fluidificante de la sangre, afecciones hepáticas y renales, diaforético, procesos gripales y catarrales, carminativo, afecciones digestivas, como usos externos, enjuagues, gargarismos, cicatrizante de heridas, caída del cabello.



T. platyphyllos

Es una de las plantas más importantes desde el punto de vista medicinal. Aunque apenas poseen aceites esenciales, contienen sin embargo mucílagos, taninos, azúcares y más de diez glucósidos diferentes (ASOCAE ONGD 2010).

XVII.- *Valeriana ceratophylla* (Valeriana). Familia Valerianaceae.

Esta planta ha sido utilizada desde tiempos inmemoriales, por sus conocidas propiedades para tratar las afecciones del sistema nervioso. Sus usos típicos son: como sedante, miorelajante, tranquilizante, anticonvulsivo, ansiolítica, calmante, tónico, antiespasmódica e hipnótica.



V. ceratophylla

Se dice que esta planta es la más importante de todas las que poseen propiedades sedantes del sistema nervioso, de los órganos digestivos y de otros que son regulados por el sistema neurovegetativo.

Composición química:

Ésteres iridoides: valepotriatos o valtratos, baldrinal. Aceite esencial: 0,5 a 1,5%. Hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos como el alfa pineno, fenmeno, camfeno, beta pineno, limoneno, beta bisabolol, alfa curcumeno, valleno, y el criofielno. También encontramos cetonas, ácido hesperético también llamado isoferúlico, aldehídos,

alcoholes y ésteres terpénicos como valeranona y valerona, isovalerianato de bornilo y valeranal. Alcaloides: 0,05 a 0,1%. Además los siguientes compuestos: actinidina, isovaleramida, valerina, valerianina, chatinina, y pirril-alfa-metilcetona. Cuando está seca se forma el ácido isovaleriánico que es el responsable de su característico olor.

Principio activo: aceite esencial con alto contenido de citral, además, contiene geronial, linalol, metilheptona, citronelal, limoneno, diterpeno (Melgarejo López *et al.* 2004).

XVIII.- *Cymbopogon citratus* Stapf (Zacate limón), familia: Poaceae, alt. Gramineae.

La especie *C. citratus* Stapf, popularmente conocida como zacate limón, es una planta perenne que generalmente no florece, se encuentra muy disponible y se emplea, tradicionalmente, en el tratamiento de uñas encarnadas y otras afecciones cutáneas (Guerra-Ordóñez *et al.* 2004).



C. citratus

En esta planta se han realizado estudios agrotécnicos, de actividad antiinflamatoria, analgésica, antiasmática, diurética, antispasmódica y antimicrobiana, toxicidad y genotoxicidad, entre otros.

El aceite esencial es mundialmente conocido por sus múltiples usos. De las partes aéreas de la planta se han aislado sustancias no volátiles, entre las cuales se pueden mencionar flavonoides, ácido cafeico, fructuosa y sacarosa. Entre los componentes volátiles, terpenos como el geraniol y citronelol.

XIX.- *Casimiroa edulis* (Zapote blanco), familia: Rutaceae.

El uso tradicional de esta planta es como sedativa, hipnótico e hipotensivo. El aceite esencial de las hojas de *C. edulis*, está constituido principalmente por sesquiterpenos hidrocarbonados, predominando el D-germacreno y el (E)-cariofileno (Miller *et al.* 2009).



C. edulis

XX.-*Phalaris canariensis* (Alpiste), familia: Poaceae.

En el país se encuentra en los estados de Sinaloa, Durango, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Baja California Norte, Chiapas, Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Yucatán. (CONABIO 2009).



P. canariensis

La semilla de alpiste está compuesta de almidón, lípidos, resina, ácidos salicílico y oxálico. Un estudio realizado por (Takagi y Iida 1980) demostró que el extracto etéreo de *P. canariensis* es un potente antioxidante.

Además de contener péptidos en su semilla que son capaces de inducir la producción de NO en cantidades similares al Captopril (CPT) y bradiquinina (BK) (Estrada-Salas *et al.* 2014).

MICROBIOLOGÍA

Dermatofitos.

Generalidades.

Las dermatofitosis o comúnmente llamadas tiñas, son un conjunto de micosis superficiales que afectan la piel y sus anexos (uñas y pelo), son causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina denominados dermatofitos, y que excepcionalmente invaden tejidos profundos. Son padecimientos cosmopolitas, aunque se presentan casi siempre en climas cálidos y húmedos. En México es un padecimiento común, se encuentra dentro de las 10 dermatosis más frecuentes de consulta. Aunque son padecimientos totalmente benignos, es importante el reconocimiento de ellos para evitar los focos de infección.

Los dermatofitos son un grupo de hongos que se reproducen asexualmente por macro y microconidias, están comprendidos en tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (Bonifaz 2012).

(Ali-Shtayeh y Ghdeib 1999) reportaron actividad antifúngica de *J. regia* sobre *Microsporum canis*, *Trichophyton violaceum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Género *Microsporum* (Gruby 1843).

Se caracterizan por presentar abundantes macroconidias de muy diversas formas como fusiformes, claviformes, ovals, etc.; miden entre 40-60 μm de largo por 5-15 μm de ancho, con paredes gruesas (3-5 μm), tienen septos transversales, que dependiendo de las especies son de 5-15 μm ; genera además escasas microconidias de aspecto piriforme y en algunas ocasiones pueden estar ausentes.

Dos son las especies más aisladas en México: *M. canis* y *M. gypseum*, y hay algunos reportes de *M. nanum*.

***M. canis* (Bodin 1902).**

En México es uno de los principales agentes etiológicos de la tiña de la cabeza y del cuerpo. La parasitación del pelo suele ser ecto-endótrix, teniendo como preferencia la ectótrix. Se desarrolla en un tiempo promedio de 6-8 d a temperatura ambiente en medio agar Sabouraud. Las colonias son de aspecto veloso, plano, de color amarillo con micelio blanco, al reverso presenta un pigmento amarillo-naranja, que se difunde a través del medio. Presenta abundante micelio, con hifas delgadas, tabicadas y ramificadas, que dan el aspecto de un árbol; las hifas pueden tener la modalidad de raquetas intercalares, similares a “huesos de perro” (Bonifaz 2012).

***M. gypseum* (Bodin) Guiart y Grigorakis 1928.**

Se aísla de tiñas de los pies, cuerpo y en raras ocasiones de la cabeza. La parasitación del pelo suele ser ecto-endótrix, teniendo como preferencia ectótrix. Se desarrolla en un tiempo promedio de 8-10 d a temperatura ambiente en medio agar de Sabouraud. La colonia es ilimitada de aspecto polvoso o arenoso, al inicio es de color blanco y posteriormente se torna beige; al reverso no presenta ningún pigmento. Presenta poco micelio, delgado y tabicado con gran cantidad de macroconídias, en forma de huso de hojas de árbol, estas contienen una capa delgada. Las macroconídias forman septos que se extienden de membrana en membrana (Bonifaz 2012).

M. nanum.

Crece moderadamente rápido y el diámetro de la colonia va de 1-3 cm incubado a temperatura ambiente por 7 d en medio agar de Sabouraud. La textura es polvosa, algodonosa, delgada y extendida, aterciopelada o plana. El color de la colonia es blanco o beige oscura y en el fondo de la placa se observa un color rojo marrón. Produce hifas septadas, macroconídias y microconídias (Doctorfungus.org 2010).

Género *Trichophyton.*

Se caracteriza por presentar abundantes microconidias de aproximadamente 2 a 4 μm de tamaño, con diversas formas, como piriformes, esféricas, claviformes, tiene pocas microconidias en forma de clava o de puro que llegan a medir de 40 a 50 μm de largo por

5 a 10 μm de ancho, tienen paredes lisas y delgadas, con septos transversales de 3-5 μm dependiendo de la especie.

Las especies más aisladas en México son: *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* y *T. interdigitale*; en menor proporción *T. concentricum*, *T. violaceum* y *T. ochraceum*.

***T. rubrum* (Castellani) Sabouraud 1911.**

Es el principal agente etiológico de la tiña de los pies, ingle, uñas y cuerpo. Excepcionalmente ataca el pelo y por lo general presenta una imagen endotrix.

La colonia se desarrolla en un tiempo promedio de 15 d, en medio de Sabouraud a temperatura ambiente. Existen dos tipos de cepas: vellosas y granuladas, siendo más frecuentes las primeras e inclusive algunos autores las consideran más virulentas.

***T. tonsurans* (Malmsten 1845).**

Se aísla frecuentemente de tiña de la cabeza y del cuerpo. La parasitación del pelo es endótrix. La colonia se desarrolla en un tiempo promedio de 10 – 15 d, en medio agar de Sabouraud a temperatura ambiente; es limitada, aterciopelada, beige o beige-café y puede presentarse de tres formas: acuminadas, cerebriiformes o crateriformes. Al reverso de la colonia se observa un pigmento café-oscuro difusible, a veces con tonalidad ocre (variedad *sulfureum*).

***T. mentagrophytes* (Robin) Blanchard 1896.**

Incluye 4 variedades: *asteroides*, *granulosum*, *lacticolor* y *radians*; sin embargo, existen otras especies (o variedades) como *T. interdigitale* y *T. erinaceri*, que tienen una micromorfología prácticamente igual, por lo que autores como Rippon la consideran como variedades de *T. mentagrophytes*.

Se aísla con frecuencia de tiña de los pies, uñas, ingle y cuerpo; en raras ocasiones afecta la cabeza. La parasitación del pelo es microide. Presenta dos tipos de colonias muy similares a las de *T. rubrum*; éstas se desarrollan de 8 – 12 d a temperatura ambiente en medio agar de Sabouraud (Bonifaz 2012).

BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA.

La resistencia a antibióticos se define como la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente (Madigan *et al.* 2009). Ésta es causada por mutaciones en el cromosoma bacteriano, plásmidos o transposones que pueden transferir determinada resistencia a diversas especies de microorganismos más rápido que los nuevos fármacos que se desarrollan para combatirlos (Kimpe *et al.* 2003; Salipante *et al.* 2003; Shahid *et al.* 2003).

La resistencia a los antibióticos constituye un problema serio de salud pública en el mundo el cual se ha agudizado durante los últimos años, especialmente en los países subdesarrollados donde su uso indiscriminado ha propiciado la aparición de cepas bacterianas multirresistentes a los antibióticos.

Hay varias razones por la que los microorganismos pueden tener una resistencia inherente a los antibióticos: 1) el organismo puede carecer de la estructura que inhibe el antibiótico; 2) el organismo puede ser impermeable al antibiótico; 3) el organismo puede alterar el antibiótico; 4) el organismo puede modificar la diana del antibiótico; 5) por un cambio genético, alteración que puede tener lugar en una ruta metabólica que bloquea el antimicrobiano; 6) el organismo puede ser capaz de bombear hacia afuera un antibiótico que haya entrado en la célula mecanismo de eflujo (Madigan *et al.* 2009).

Las cepas bacterianas resistentes son altamente transmisibles y se diseminan rápidamente debido a la infraestructura ineficiente en salud pública y las prácticas de control erradas de las infecciones. De hecho, uno de los grupos de antibióticos más utilizados en la actualidad y con gran significancia clínica es el llamado grupo de los β -lactámicos, los cuales incluyen las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenems y monobactámicos, entre otros, los cuales son ampliamente utilizados para el tratamiento

de diversas infecciones bacterianas, debido a su baja toxicidad y su amplio espectro de acción (Cockerill *et al.* 2012; Mandel *et al.* 2002; Martínez-Martínez *et al.* 1998).

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas causadas principalmente por enterobacterias, así como, el surgimiento de cepas resistentes y multirresistentes a los antibióticos, son elementos que constituyen los mayores problemas de la medicina actual y futura, estos factores dificultan el tratamiento de las enfermedades infecciosas y deterioran la calidad de vida del individuo. Entre los antimicrobianos más ampliamente utilizados se encuentran los betalactámicos. Poseen similitud estructural con los sitios de unión de los substratos bacterianos, lo que le permite unirse e inactivar las transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas necesarias para la síntesis del peptidoglucano de la pared celular. Entre estos se encuentran: la penicilina, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos, los cuales continúan siendo objeto de modificaciones bioquímicas dirigidas a modular su actividad antimicrobiana (Forero Gómez 2002).

Las betalactamasas son el principal mecanismo de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos. Son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen, bien sea cromosómico o transferido por plásmidos o transposones, actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, lo que provoca que el antibiótico pierda la capacidad de unirse a las proteínas ligadoras de penicilina o (PBP); la producción de estas enzimas puede ser constitutiva o inducida (Sandrea-Toledo *et al.* 2007).

Las betalactamasas de espectro expandido (BLEE o ESBL), son enzimas derivadas por mutaciones de las betalactamasas clásicas del grupo 2b de la clasificación de Bush (Bush *et al.* 1995); se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual facilita su diseminación, no sólo entre distintas cepas de la misma especie, sino también entre bacterias de distintos géneros y grupos (Bush y Miller 1998).

Las BLEE constituyen un problema terapéutico y epidemiológico, en el caso de las infecciones causadas por enterobacterias, ya que las bacterias productoras de este tipo de betalactamasas son resistentes a las penicilinas, las cefalosporinas y el aztreonam, y un 30% a 60% de ellas también a los betalactámicos asociados a inhibidores de

betalactamasas; además, un porcentaje alto, por corresponsencia, son también resistentes a las quinolonas, los aminoglucósidos, las tetraciclinas y el cotrimoxazol (Gobernado 2005).

En México existen algunos reportes que documentan este tipo de problema con altos índices de morbilidad. Entre éstos destacan el brote producido por *K. pneumoniae* (SHV-5) en un hospital de Cuernavaca, Morelos, que incluyó 21 niños menores de 2 meses, 13 de los cuales fallecieron (62%) (Silva *et al.* 2001). Así también, se reportó un brote ocurrido en un hospital de la ciudad de México donde se obtuvieron cepas BLEE (SHV-5) procedentes de 8 pacientes, de los cuales 4 fallecieron (50%) además documentaron la diseminación de cepas de *K. pneumoniae* (SHV-5) en un hospital pediátrico de la ciudad de México, y en un hospital de Durango ocurrió un brote con 82 aislamientos clínicos en los Servicios de Pediatría y en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales donde se identificaron cepas BLEE (SHV-5 y TLA-1).

Staphylococcus aureus meticilina resistente (MRSA) es la causa de infecciones emergentes en la población, resultado de cepas que difieren de las habituales asociadas a la salud y se conocen como cepas CA-MRSA (Community-associated MRSA). En base a definiciones recientes (CDC Department of Health and Human Services 2005).

En la actualidad, la infección por MRSA se considera un importante problema de salud pública porque afecta a personas jóvenes inmunocomprometidas (Karvouniaris *et al.* 2010).

El mecanismo principal de resistencia a la meticilina (cepas MRSA) es no dependiente de penicilinas, sin embargo en la producción de *S. aureus* de una proteína diferente de unión a penicilina, PBP2A o PBP2A', con baja afinidad a la unión de β -lactámicos (Appelbaum 2007). El gen *meca* codifica para la proteína de unión a penicilina PBP2A, la cual permite la síntesis de la capa de peptidoglicana y la síntesis de la pared celular en presencia de β -lactámicos (Deurenberg *et al.* 2007).

Por lo tanto, estas cepas son consideradas más virulentas que las cepas adquiridas en los hospitales (HA-MRSA, hospital-acquired MRSA); además, estas cepas están desarrollando gradualmente resistencia a otras clases de antibióticos además de todos los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems) (Bartlett 2008).

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 y 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%) (Selvey *et al.* 2000). Con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad. Un hospital pediátrico de tercer nivel en México, registró un franco predominio de *S. aureus* relacionado con bacteriemias nosocomiales (Díaz-Ramos *et al.* 1999). Una revisión retrospectiva de 23 años, sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara, México, reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia de 36% en esas infecciones (Chávez 2004). En México, diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales indicaron que de 8.3 a 36% de esas infecciones fueron atribuibles a *S. aureus* (Molina y Garza 1999; Ponce De León *et al.* 1999; Vargas Olmos y Salgado Camarillo 2004; Camacho-Ramírez *et al.* 2002).

Clasificación *Escherichia coli*.

Tabla 1. Taxonomía de *E. coli*

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>coli</i>

Por lo general la *E. coli* es la causa más común de infección del aparato urinario y es responsable del casi 90% de las infecciones primarias en mujeres jóvenes, también es

causante de diarrea en todo mundo. Las especies de *E. coli* se clasifican por las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente.

Clasificación *Staphylococcus aureus*.

Tabla 2. Taxonomía de *S. aureus*

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>aureus</i>

Staphylococcus aureus es un agente patógeno que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo.

Produce infección de piel y partes blandas, neumonía, sialadenitis, sepsis con o sin metástasis, osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados, orzuelos. Algunas enfermedades producidas por sus toxinas son el síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis.

Clasificación *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 3. Taxonomía de *P. aeruginosa*

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<i>Pseudomonas</i>
Especie:	<i>aeruginosa</i>

Es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, *P. aeruginosa* infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de la sangre (septicemia).

Clasificación *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 4. Taxonomía de *K. pneumoniae*

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Klebsiella</i>
Especie:	<i>pneumoniae</i>

Éste género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes mellitus o alcohólicos. Al día de hoy también existe una fuerte teoría que la relaciona con la Espondilitis Anquilosante.

Causa alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales en pacientes debilitados que puede terminar con la vida del paciente. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema.

Clasificación *Acinetobacter baumannii*.

Tabla 5. Taxonomía de *A. baumannii*

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Proteobacteria gamma
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Moraxellaceae
Género:	<i>Acinetobacter</i>
Especie:	<i>baumannii</i>

A. baumannii es un bacilo pleomórfico aerobio gram negativo (similar en apariencia a *Haemophilus influenzae* en tinción de Gram), comúnmente aislado de ambientes hospitalarios y de pacientes hospitalizados. Es un organismo de agua y preferencialmente coloniza ambientes acuáticos. Los aislados clínicos son frecuentes de esputo o de secreciones respiratorias, heridas y orina. En condiciones hospitalarias, *Acinetobacter* comúnmente coloniza soluciones de irrigación y soluciones intravenosas; las especies son de baja virulencia pero son capaces de causar una infección (Cunha 2015).

En años recientes *Acinetobacter baumannii* se ha convertido en la principal causa de pneumonias asociadas a ventilador (VAP) (Rosenthal *et al.* 2006; Leblebicioglu *et al.* 2007; Rello *et al.* 1999). El acelerado desarrollo de resistencia a la mayoría de antibióticos se ha convertido en una variable importante en la influencia de la mortalidad en pacientes con VAP. Por otra parte, *A. baumannii* tiene la capacidad de sobrevivir en la mayoría de las superficies ambientales por largos períodos de tiempo, esto promueve la transmisión ambiente-paciente del microorganismo, especialmente por los trabajadores de la salud

(Villegas y Hartstein 2003; Abbo *et al.* 2007). Muchos brotes que han sido reportados son debidos a la contaminación de superficies y aparatos los cuáles fueron eficientemente controlados con limpieza del ambiente y una apropiada desinfección de manos y aparatos. Además, la colonización en los pacientes juega un papel importante en la infección y la propagación de los microorganismos a otros pacientes.

Hace casi 25 años, los investigadores observaron la resistencia adquirida de *A. baumannii* a los antibióticos comúnmente utilizados en esa época, entre ellos aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefamicinas, la mayoría de los aminoglucósidos, cloranfenicol y tetraciclina (Murray y Moellering 1979).

Clasificación de *Enterococcus faecalis*.

Tabla 6. Taxonomía de *E. faecalis*

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Lactobacillales
Familia:	Enterococcaceae
Género:	<i>Enterococcus</i>
Especie:	<i>faecalis</i>

Los enterococos son parte de la flora intestinal normal de los humanos y animales pero también son importantes patógenos responsables de infecciones serias. El género *Enterococcus* incluye más de 17 especies, pero solo unas pocas causan infecciones de interés clínico en humanos. Con el incremento de la resistencia a antibióticos, los enterococos son reconocidos como temidos patógenos nosocomiales que pueden ser difíciles de tratar.

En las últimas dos décadas, los enterococos han emergido como patógenos oportunistas presentándose en endocarditis, bacteriemia y otras infecciones en pacientes que tienen enfermedades graves prolongada o que están inmunocomprometidos (Mundy *et al.* 2000; Low *et al.* 2001; Koch *et al.* 2004). Su prevalencia en infecciones

nosocomiales pudieran ser explicadas por sus resistencias naturales y adquiridas a numerosos antibióticos (Koch *et al.* 2004; Oprea *et al.* 2004) pero también por la presencia de factores de virulencia sutiles, principalmente secretados y asociados con proteínas de la pared celular que promueven la colonización de los tejidos, confieren una ventaja en el crecimiento, o aseguran una protección en contra de la respuesta inmune innata y adquirida (Shankar *et al.* 1999; Eaton y Gasson 2001).

Entre las especies de *Enterococcus* usualmente descritas, *E. faecalis* es la más frecuente identificada en aislados clínicos, en un rango del 80% al 90% de los casos (Mundy *et al.* 2000; Kühn *et al.* 2003).

A pesar del incremento en el reconocimiento de la importancia clínica de las infecciones enterocócicas, sus mecanismos de patogenia no están muy bien entendidos. En este sentido, solamente un limitado número de factores de virulencia han sido descritos principalmente para *E. faecalis* (Benachour *et al.* 2009).

ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un gran aumento en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares. Un aspecto particularmente destructivo de éste es la producción de especies de oxígeno reactivo, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (Laboratorio de Estrés Oxidativo EOX 2008).



Figura 1. Principales agentes del estrés oxidativo.

Células Vero.

Derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) desde 1960, son de las líneas celulares de mamífero continuas comúnmente utilizadas en la investigación. Ésta línea células adherente ha sido utilizada por mucho en estudios de virología, pero también ha tenido otras aplicaciones, incluidas estudios de propagación y de bacterias intracelulares (*Rickettsia spp*) y parásitos (*Neospora*) y en la valoración de los efectos de químicos, toxinas y otras sustancias en las células de mamífero a nivel molecular (Ammerman *et al.* 2008).

JUSTIFICACIÓN

Cada vez son más los microorganismos resistentes a los fármacos conocidos, ya sea por el uso indiscriminado de los antibióticos o por su adaptación evolutiva. Además el cuerpo humano se enfrenta a niveles más altos de estrés, que representan la causa mayor del desgaste celular o su alteración. Éstas condiciones de estrés oxidativo implican la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS, radicales libres), generadas en el metabolismo de la célula, afectando moléculas de gran importancia biológica como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Por tal motivo, el estudio de la citotoxicidad de una molécula biológicamente activa, presume el daño posible que ésta pueda causar en líneas celulares diferenciadas. Existen reportes previos en los cuales se aislaron moléculas con actividad biológica (bactericida, fungicida o antioxidante) a partir de sistemas metanólicos; la búsqueda de sistemas de extracción orgánica nos llevó a considerar que aquellos solventes que se utilizaron debieron poseer ciertas características; en este trabajo se desarrolló un sistema metanólico debido a su polaridad (alta, 0.95, comparada con la del etanol 0.88), considerando también su bajo punto de ebullición (64.7°C, comparado con el del etanol, 78.5°C) que nos permitió en mayor parte retirarlo del extracto crudo, a concentraciones no tóxicas para el organismo; de este contexto partió el proyecto al cual estuvo inmerso este trabajo (Dr. José Alejandro Almaguer González, Dirección de medicina tradicional y desarrollo intercultural, SEGOB, 2010). En la búsqueda de moléculas con potencial antimicrobiano de polaridad alta podemos mencionar a los aminoglucósidos, que son introducidos a través de la membrana por sistema de transporte activo primario, que de acuerdo a la polaridad de nuestro solvente se esperaron aislar moléculas con características similares. Por estas razones, la investigación nos dirigió al campo de la química de los productos naturales, para aislar e identificar nuevas moléculas como una alternativa para el tratamiento de éstos diversos problemas.

HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana (*Apium graveolens* L; *Azadirachta indica*;; *Castela texana*; *Equisetum robustum* A. Br; *Amphipterygium adstringens*; *Eucalyptus globulus*; *Larrea tridentata*; *Verbascum thapsus*; *Stevia rebaudiana*; *Foeniculum vulgare*, *Matricaria recutita*; *Carya illinoensis*; *Passiflora incarnata*; *Arctostaphylos pungens*; *Rosmarinus officinalis*; *Tilia platyphyllos*; *Valeriana ceratophylla*; *Cymbopogon citratus*; *Casimiroa edulis*, *Phalaris canariensis*), presentan moléculas biológicamente activas como bactericidas, fungicidas, antioxidantes y no presentan citotoxicidad sobre células normales de mamífero.

OBJETIVO GENERAL:

Identificar las moléculas biológicamente activas de plantas medicinales del norte de México, responsables de la actividad bactericida, fungicida, antioxidante y evaluar su citotoxicidad sobre células normales de mamífero (Vero, riñón de mono).

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Obtener los extractos metanólicos por el método Soxhlet de 20 plantas medicinales de uso etnobotánico (Tabla 7).
2. Evaluar la actividad bactericida sobre cepas de importancia médica ATTC y de aislados clínicos con resistencia a antibióticos (Tabla 8) y fungicida sobre hongos dermatofitos (Tabla 9) de los extractos metanólicos de las 20 plantas medicinales en estudio.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos metanólicos que muestren mayor actividad.
4. Fraccionar los extractos activos por técnicas cromatográficas y evaluar la actividad antimicrobiana por bioautografía.
5. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las 20 plantas medicinales en estudio.
6. Evaluar la citotoxicidad de los extractos activos sobre la línea celular Vero (riñón de mono).
7. Identificar la o las moléculas biológicamente activas de las fracciones mediante técnicas espectroscópicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

- ✓ Material vegetal.

Se seleccionaron 20 plantas medicinales de uso tradicional de la casa comercial PACALLI®, previa identificación.

Tabla 7. Plantas en estudio.

Nombre Científico	Nombre común
<i>Apium graveolens</i> L	Apio
<i>Castela texana</i>	Chaparro amargoso
<i>Equisetum robustum</i> A. Br	Cola de caballo
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Cuachalalate
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
<i>Larrea tridentata</i>	Gobernadora
<i>Verbascum thapsus</i>	Gordolobo
<i>Stevia rebaudiana</i>	Hoja dulce
<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo
<i>Matricaria recutita</i>	Manzanilla
<i>Carya illinoensis</i>	Nogal
<i>Passiflora incarnata</i>	Pasiflora
<i>Arctostaphylos pungens</i>	Pingüica
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero
<i>Tilia platyphyllos</i>	Tila
<i>Valeriana ceratophylla</i>	Valeriana
<i>Cymbopogon citratus</i>	Zacate limón
<i>Casimiroa edulis</i>	Zapote blanco
<i>Phalaris canariensis</i>	Alpiste
<i>Azadiratcha indica</i>	Neem

✓ Bacterias en estudio

Se consideraron bacterias Gram negativas como positivas.

Tabla 8. Bacterias de importancia clínica en estudio.

Gram negativas	Cepa	Gram positivas	Cepa
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	ATCC BAA-44
<i>E. coli</i>	Aislado clínico	<i>S. aureus</i> MRSA	Aislado clínico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>P. aeruginosa</i>	Aislado clínico	<i>E. faecalis</i> .	Aislado clínico
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 15308		
<i>A. baumannii</i>	Aislado clínico		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603		
<i>K. pneumoniae</i>	Aislado clínico		

✓ Hongos en estudio

En este estudio se consideraron los siguientes hongos dermatofitos.

Tabla 9. Hongos dermatofitos en estudio.

<i>Microsporum canis</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>M. gypseum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
<i>M. nanum</i>	<i>T. tonsurans</i>

✓ Células de mamífero:

Línea celular VERO, células epiteliales de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*.

Obtención de extractos metanólicos.

Se pesaron 30 g de material vegetal seco y molido (Tabla 7) y se colocaron en un equipo Soxhlet con 500 mL de metanol (CTR Scientifics) hasta agotar la extracción, al extracto obtenido se le eliminó el solvente con ayuda de un rotavapor (Buchii), cada extracto crudo se llevó a sequedad completa en estufa de secado a temperatura menor a 50 °C. y después se determinó su rendimiento y se almacenó en frascos, hasta su uso (D'Sousa' Costa *et al.* 2015).

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{(100)(g \text{ extracto seco})}{g \text{ de la planta seca}}$$

Determinación de la actividad antibacteriana.

Con los extractos obtenidos se realizaron las pruebas para la determinación de la actividad antimicrobiana sobre microorganismos (Tabla 8) con resistencia a antibióticos, por el método de difusión en placa. El método empleado para el ensayo microbiológico fue el de difusión en placa en pozo.

Método de difusión en placa en pozo.

En este método, se colocaron sobre una placa con medio sólido C. Rivas (Rivas Morales *et al.* 2007) previamente inoculada con 100 µL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC, y se realizaron pocillos de 6 mm de diámetro a los cuáles se les agregaron 20 µL de cada uno de los extractos a una concentración de 50 mg/mL. Como control negativo se utilizaron 20 µL del solvente empleado para disolver el extracto y como control positivo 20 µL de un antibiótico que causó sensibilidad en la cepa bacteriana (2 mg/mL). Se incubó la placa 24 h a 37 °C; después de este período se midieron los halos de inhibición del crecimiento expresados en mm para cada extracto. (Barrow y Feltham 2003; Alia 2009).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Los extractos que mostraron mayor halo de inhibición por el método de difusión en placa se les determinó la CMI. En una microplaca de 96 pozos se agregaron 100 µL de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 UFC., y se añadieron 100 µL de cada una de las muestras de los extractos con su dilución seriada y llevada a 1:50 (20 µL

de extracto + 980 μL de medio de cultivo) correspondiente con concentraciones finales de 2,900 hasta 45.312 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente la microplaca se incubó por 24 h a 37 °C. Para determinar la concentración mínima inhibitoria de cada una de las fracciones se tomó lectura de la absorbancia en un lector de microplacas ELx800 (BIO-TEK) a una longitud de onda de 540 nm, la concentración más baja en la cual la absorbancia fue igual a la del blanco se tomó como la CMI de las diluciones probadas (Drummond y Waigh 2000; Clinical and Laboratory Standards Institute 1999).

Determinación de la actividad antifúngica.

La actividad antifúngica se evaluó sobre cepas de dermatofitos (Tabla 9) con el extracto obtenido de las 20 plantas en estudio, ésta se determinó por el método de difusión en placa con medio de cultivo sólido C. Rivas con algunas modificaciones. Primeramente las placas con el medio de cultivo se inocularon por picadura las cepas en estudio y se incubaron a 25 ± 2 °C por 15 d para la formación de macro y microconidias, éstas se cosecharon y se ajustaron a una solución de 2×10^4 conidias/mL en agua destilada (Araújo *et al.* 2009). 100 μL de esta solución se inocularon en la placa con ayuda de asa Drigalsky para su extensión, posteriormente se hicieron pocillos en la placa con ayuda de una pipeta Pasteur estéril (6 mm de diámetro) en las cuales se depositaron 20 μL del extracto metanólico crudo de cada una de las plantas en estudio a una concentración de 100 mg/mL y el mismo volumen de ketoconazol (5 mg/mL, Química y Farmacia S.A. de C.V.) y metanol (CTR, Scientific) como controles positivo y negativo respectivamente. Luego se llevaron a incubación a 25 ± 2 °C en atmósfera húmeda por 7 d. Al concluir el período de incubación se observó la presencia de un halo de inhibición alrededor del pocillo y se determinó la actividad fungicida, todos los ensayos se corrieron por triplicado (Fernández-Torres *et al.* 2001).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).

Para la determinación de la CMI se siguió el protocolo del método de microdilución establecido por la NCCLS M38-A para hongos filamentosos con una modificación (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008). Se preparó el inóculo de conidias a una densidad óptica (0.08-0.1 UA) y se realizó la lectura en un

espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific) a 625 nm, de esta solución se tomó una alícuota y se hizo una dilución 1:50 en medio líquido C. Rivas. Quedando como concentración final del extracto de 5.8 a 0.01 mg/mL, y 0.5 µg/mL de ketoconazol y metanol como controles positivo y negativo respectivamente. En una placa de 96 pocillos se colocaron 100 µL de la solución diluida de conidias más 100 µL de la dilución de los extractos y controles. Posteriormente se incubaron a las mismas condiciones antes mencionadas por 7 d. Al término de éste se observaron los pocillos para verificar el crecimiento de los dermatofitos, y se determinó como CMI la última concentración donde hay inhibición del crecimiento; de éstos pocillos se tomó una asada y se inoculó en medio sólido C. Rivas y se incubó a las mismas condiciones por 7 d, Se determinó la CMF que corresponde a la concentración donde no hay crecimiento.

Fraccionamiento de los extractos activos.

Aquellos extractos que resultaron más activos se llevaron a un fraccionamiento, primeramente en cromatografía en capa fina (TLC), y después a una cromatografía en columna, se utilizaron sistemas de solventes de menor a mayor polaridad, siendo hexano, acetona y metanol (CTR, Scientifics) los que se eligieron en diferentes proporciones. Las placas de vidrio para TLC fueron de 25 x 75 mm con sílica gel 60 (Fluka) sin indicador de fluorescencia; una vez obtenidas las cromatoplasmas se revelaron con luz UV y con cloruro de cobalto (CoCl₂), para obtener las relaciones de frente de las bandas que se separaron, después éstas placas se esterilizaron con luz UV por 30 min en una campana de flujo laminar colocada dentro de una caja de Petri de vidrio, luego sobre la cromatoplasma se colocó una tira de medio C. Rivas sólido mismo que se inoculó con 100 µL de la solución estandarizada de bacterias o conidias anteriormente referenciadas; a la caja de Petri le fue colocada su tapa y se llevó a incubar bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Luego de este período se observó el crecimiento o zonas de inhibición. Ésta separación nos permitió determinar las proporciones de los solventes para la cromatografía en columna donde la sílica que se utilizó fue 60 G (Sigma Aldrich) de 63 -200 mallas con dimensiones de la columna 330 mm x 28 mm. Lo que nos permitió coleccionar fracciones para su evaluación posterior.

Determinación de la capacidad de captura de radicales libres.

La determinación de captación del radical ABTS^{•+} Se realizó por la técnica establecida por (Re *et al.* 1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS^{•+} se formó tras la reacción de ABTS (Sigma-Aldrich, 7 mM) con persulfato de potasio (2,45 mM,) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.200 a 734 nm. Se colocaron 1980 μ l del radical libre en tubos de vidrio y se hicieron reaccionar con 20 μ L de las soluciones de los extractos a concentraciones de 3.15 a 50 μ g/mL; a excepción del extracto de gobernadora, este fue de 0.6 a 50 μ g/mL. Se tomó lectura de la mezcla de reacción al minuto 1 y 6 a 734 nm, los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizó una curva de calibración con TROLOX[®] (Sigma-Aldrich) 15 mM a 3 mM (0.75 – 3.75 μ g/mL), se determinó el porcentaje de inhibición bajo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{(Abs \text{ inicial}) - (Abs \text{ final})}{(Abs \text{ inicial})} * 100$$

Y con esos datos se calculó la Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) por medio del paquete estadístico SPSS a través de un análisis Probit, después se determinó la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) según la siguiente fórmula (Mhadhebi *et al.* 2014):

$$TEAC \left(TROLOX \frac{mg}{100g \text{ planta}} \right) = \frac{IC_{50} Trolox}{IC_{50} muestra} \times 100$$

Determinación de citotoxicidad.

Se determinó la viabilidad celular de la línea Vero por el método colorimétrico de reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-bromuro difeniltetrazolio (MTT) (Riss *et al.* 2004). La cadena respiratoria y otros sistemas de transporte de electrones reducen el MTT y otras sales de tetrazolio, formando cristales de tetrazolio no solubles de color violeta. La cantidad de estos cristales pueden ser determinados por espectrofotometría y sirve como un estimado del número de mitocondrias, y de aquí el número de organismos vivos en la muestra.

Para realizar este ensayo se utilizó una microplaca de 96 pozos a los cuales se les agregó 100 μL de medio DMEM (Sigma Aldrich) estandarizado con 5×10^4 células/mL, después de 24 h, se retiró el medio y se colocó 100 μL de medio con el extracto metanólico o fracción activa de las plantas en estudio, los cuáles se prepararon en dilución 1:100 y cuyas concentraciones finales fueron de 1000, 500, 250, 125 y 62.5 $\mu\text{g/mL}$, el volumen del solvente fue del 1%, mismos que se hicieron pasar por filtro de nylon 0.22 μm para su esterilización, se incubó la placa por 24 h bajo las mismas condiciones mencionadas con anterioridad. Pasado este tiempo se retiró el medio con tratamiento y se agregaron 100 μL de medio DMEM adicionado con 10 μL de MTT 5 mg/mL (Sigma Aldrich) y se incubaron por 4 h, pasado este lapso se agregaron 100 μL de una solución solubilizante, se agitó para su homogenización y posteriormente se tomó su absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Epoch, BioTek). Los controles para el ensayo constaron de medio DMEM 10% SFB, Etanol al 1% en medio DMEM y solución solubilizante para el 100 % de mortalidad. La absorbancia es directamente proporcional al número de células viables en cada pocillo. El % de Inhibición se obtuvo bajo el siguiente criterio (Rodríguez-Álvarez *et al.* 2014):

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \frac{100 * \text{Abs tratamiento}}{\text{Abs control crecimiento}}$$

Técnicas espectroscópicas de identificación de productos naturales.

Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

Se corrió una cromatografía de gases acoplada a masas en un equipo Agilent 6890 GC bajo las siguientes condiciones: Acarreador: He; Columna capilar HP-5 MS; 1 mL/min; temperatura inicial fue 80 °C, y se incrementó a 220 °C/3 min, 300 °C/1 min; la temperatura del inyector fue de 230 °C, volumen de inyección 1 μL ; y posteriormente se identificó el compuesto responsable de la actividad por medio de la biblioteca del equipo, su espectro de masas y la literatura de referencia.

Espectroscopía Infraroja.

El espectro Infrarojo (IR) es característico de una molécula entera, lo que permite obtener información estructural en general de diversos grupos funcionales (Silverstein M *et al.* 2005). La fracción activa purificada se llevó a espectrometría IR en un espectrómetro Frontier FT-IR (PerkinElmer) disuelto en acetona (CTR Scientifics), los espectros se obtuvieron en un rango de 400 – 4000 cm^{-1} y se evaluaron mediante el software PerkinElmer Spectrum V10.4.00.0190 (PerkinElmer) para su interpretación.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La fracción activa purificada se evaluó por medio de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de Carbono 13 (^1H -RMN, ^{13}C -RMN) y sus correspondientes análisis bidimensionales de correlación (DEPT, HSQC) en un equipo Bruker Avance III HD 400 (Bruker) con acetona y metanol deuterados (Sigma Aldrich, México) con una frecuencia de 100 MHz para ^{13}C y 400 MHz para ^1H . Los espectrogramas se analizaron vía software Topspin 3.0 (Bruker) con desplazamiento químico en ppm (Khattab *et al.* 2015)

RESULTADOS.

Las plantas utilizadas se obtuvieron comercialmente por PACALLI® con su respectiva identificación. Con respecto al porcentaje de rendimiento se obtuvo que el extracto metanólico de manzanilla fue el que mostró el más alto valor de 58.82 %, mientras que el extracto metanólico de semilla de alpiste fue el de menor rendimiento 3.42% (Tabla 10).

Tabla 10. Rendimiento de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

Planta	Parte utilizada	% Rendimiento (p/p)	Planta	Parte utilizada	% Rendimiento (p/p)
Manzanilla	aérea	58.82	Pasiflora	aérea	25.89
Romero	aérea	45.33	Chaparro amargoso	aérea	19.76
Pinguica	fruto	41.6	Nogal	aérea	17.60
Gobernadora	aérea	37.63	Tila	aérea	17.07
Eucalipto	aérea	37.13	Apio	semilla	16.68
Hierba dulce	aérea	33.33	Hinojo	aérea	16.60
Gordolobo	aérea	32.25	Cola de caballo	aérea	14.96
Valeriana	aérea	32.07	Zapote blanco	aérea	14.59
Neem	aérea	27.40	Zacate limón	aérea	7.72
Cuachalalate	corteza	27.35	Alpiste	semilla	3.42

Las cepas se sometieron a su respectivo antibiograma para conocer el grado de sensibilidad o resistencia a diferentes antibióticos, la figura 2 y la tabla 11 nos muestran los resultados para la cepa de *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44.

Tabla 11. Antibiograma para *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44.

Antibiótico Gram (+)	Sensibilidad
Ampicilina (AM)	R
Cefalotina (CF)	R
Cefotaxima (CFX)	R
Ceftazidima (CF)	R
Cefuroxima (CXM)	R
Dicloxacilina (DC)	R
Eritromicina (E)	R
Gentamicina (GE)	R
Pefloxacina (PEF)	R
Penicilina (PE)	R
Sulfametoxazol/Trimetropim (SXT)	++++
Tetraciclina (TE)	+++

R = Resistente; Sensibilidad: + Ligeramente,
 ++ Moderadamente , +++ Severamente y
 ++++ Altamente

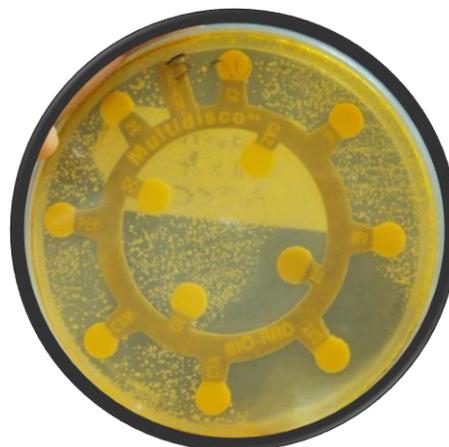


Figura 2. Antibiograma de *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44.

La actividad bactericida de las plantas en estudio se muestra en la tabla 12, donde observamos que 9 plantas tienen actividad en contra de los microorganismos tanto de referencia (ATCC), como de aislados clínicos siendo el extracto metanólico de romero y de cola de caballo quienes tuvieron actividad frente a dos géneros diferentes (*S. aureus* y *A. baumannii* respectivamente).

Dado que el extracto metanólico de romero mostró tener actividad tanto para la cepa de referencia como para el aislado clínico, se decidió llevarlo a su separación para el aislamiento e identificación de moléculas biológicamente activas.

Tabla 12. Plantas en estudio que mostraron actividad antibacteriana.

Extracto (50 mg/mL)	Halo de inhibición (mm)	Microorganismo
Nogal	10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Romero	15	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC BAA-44
Cola de caballo	12	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44
Eucalipto	12	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44
Chaparro amargoso	12	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44
Neem	1	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44
Hierba dulce	7	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC BAA-44
Romero	10	<i>S. aureus</i> (aislado clínico)
Cola de caballo	7	<i>S. aureus</i> (aislado clínico)
Gobernadora	7	<i>S. aureus</i> (aislado clínico)
Chaparro amargoso	7	<i>S. aureus</i> (aislado clínico)
Zacate limón	15	<i>Acinetobacter baumannii</i> (aislado clínico)
Cola de Caballo	9	<i>A. baumannii</i> (aislado clínico)
Cuachalalate	10	<i>A. baumannii</i> (aislado clínico)

n=3

La actividad antifúngica se llevó a cabo por el método de difusión en placa, 13 de las 20 plantas en estudio mostraron dicha actividad que se resume en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Actividad antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre el género *Trichophyton*.

Extracto (100 mg/mL)	Halo de inhibición (mm)	Microorganismo	Extracto (100 mg/mL)	Halo de inhibición (mm)	Microorganismo
Gobernadora	40	<i>Trichophyton rubrum</i>	Valeriana	10	<i>T. mentagrophytes</i>
Apio	25	<i>T. rubrum</i>	Ketoconazol	40	<i>T. mentagrophytes</i>
Tila	18	<i>T. rubrum</i>	Gobernadora	20	<i>T. tonsurans</i>
Nogal	14	<i>T. rubrum</i>	Apio	15	<i>T. tonsurans</i>
Eucalipto	12	<i>T. rubrum</i>	Manzanilla	13	<i>T. tonsurans</i>
Neem	12	<i>T. rubrum</i>	Coladecaballo	13	<i>T. tonsurans</i>
Valeriana	12	<i>T. rubrum</i>	Gordolobo	12	<i>T. tonsurans</i>
Hinojo	10	<i>T. rubrum</i>	Hinojo	12	<i>T. tonsurans</i>
Ketoconazol	40	<i>T. rubrum</i>	Romero	10	<i>T. tonsurans</i>
Apio	45	<i>T. mentagrophytes</i>	Valeriana	10	<i>T. tonsurans</i>
Gobernadora	35	<i>T. mentagrophytes</i>	Ketoconazol	30	<i>T. tonsurans</i>
Tila	15	<i>T. mentagrophytes</i>			

n = 3

Tabla 14. Actividad antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre el género *Microsporium*.

Extracto (100 mg/ml)	Halo de inhibición (mm)	Microorganismo	Extracto (100 mg/ml)	Halo de inhibición (mm)	Microorganismo
Apio	25	<i>Microsporium canis</i>	Cuachalalate	12	<i>M. gypseum</i>
Gobernadora	15	<i>M. canis</i>	Neem	10	<i>M. gypseum</i>
Neem	10	<i>M. canis</i>	Nogal	10	<i>M. gypseum</i>
Tila	10	<i>M. canis</i>	Hierba dulce	10	<i>M. gypseum</i>
Hierba dulce	10	<i>M. canis</i>	Valeriana	10	<i>M. gypseum</i>
Valeriana	10	<i>M. canis</i>	Ketoconazol	40	<i>M. gypseum</i>
Ketoconazol	40	<i>M. canis</i>	Apio	15	<i>M. nanum</i>
Gobernadora	20	<i>M. gypseum</i>	Nogal	12	<i>M. nanum</i>
Apio	15	<i>M. gypseum</i>	Tila	12	<i>M. nanum</i>
Hinojo	15	<i>M. gypseum</i>	Gobernadora	12	<i>M. nanum</i>
Eucalipto	15	<i>M. gypseum</i>	Neem	9	<i>M. nanum</i>
Tila	13	<i>M. gypseum</i>	Hinojo	8	<i>M. nanum</i>

n = 3

El extracto que se eligió para seguir con el proceso de separación, aislamiento y purificación fue el metanólico de semilla de apio.

La primera parte de la separación se realizó bajo la cromatografía en capa fina, los extractos metanólicos de romero y de semilla de apio.

Después de probar diferentes sistemas de solventes para cada uno de los extractos se decidió utilizar el sistema benceno:acetona 9:1 para la separación del extracto de romero y el sistema benceno:hexano 9:1 para el de semilla de apio.

La figura 3 presenta la TLC de la separación del extracto metanólico de romero y su respectiva relación de frentes. Que nos muestra una banda color marrón al revelarla con cloruro de cobalto.

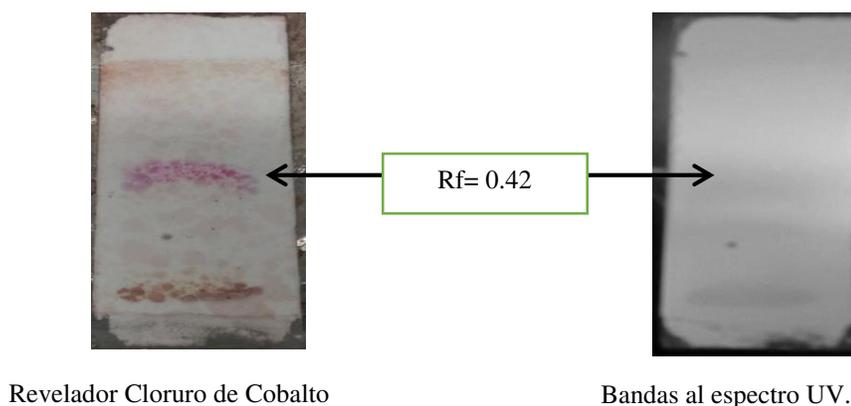


Figura 3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de romero. Sistema: Benceno:acetona 9:1.

La figura 4 muestra la TLC correspondiente a la separación del extracto metanólico de semilla de apio, donde se obtuvieron 4 relaciones de frente; bajo los reveladores de luz UV y Cloruro de cobalto.

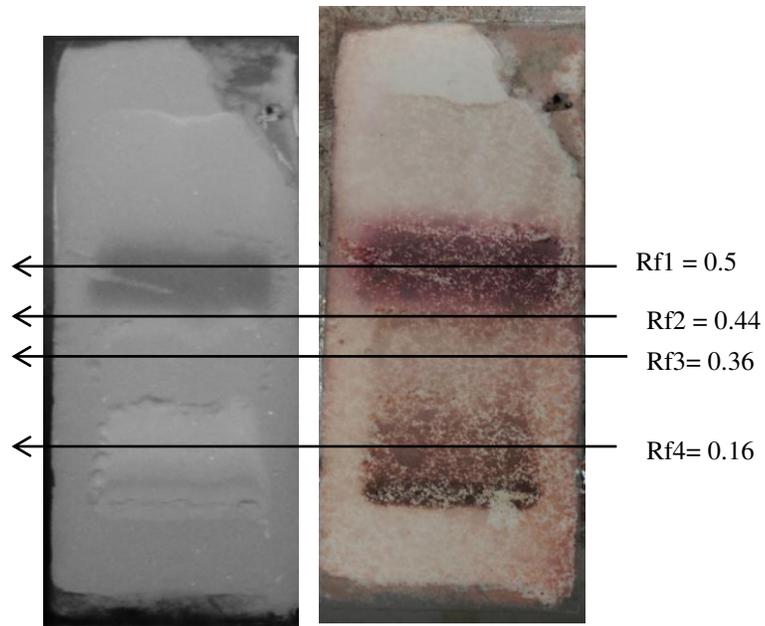


Figura 4. Bandas al UV y con revelador cloruro de cobalto, en el sistema benceno:hexano 9:1 del extracto metanólico de semilla de apio.

Una vez realizadas las separaciones cromatográficas nos dimos a la tarea de buscar en dónde se encontraba la actividad propia de cada extracto, por lo que se realizó la bioautografía para cada cromatoplaque. Se encontró que la actividad antibacteriana para el extracto de romero fue en la $R_f = 0.42$; para el extracto de semilla de apio se observó que la actividad antifúngica se extiende desde el origen hasta un $R_f = 0.5$, como se puede apreciar en la figura 5.

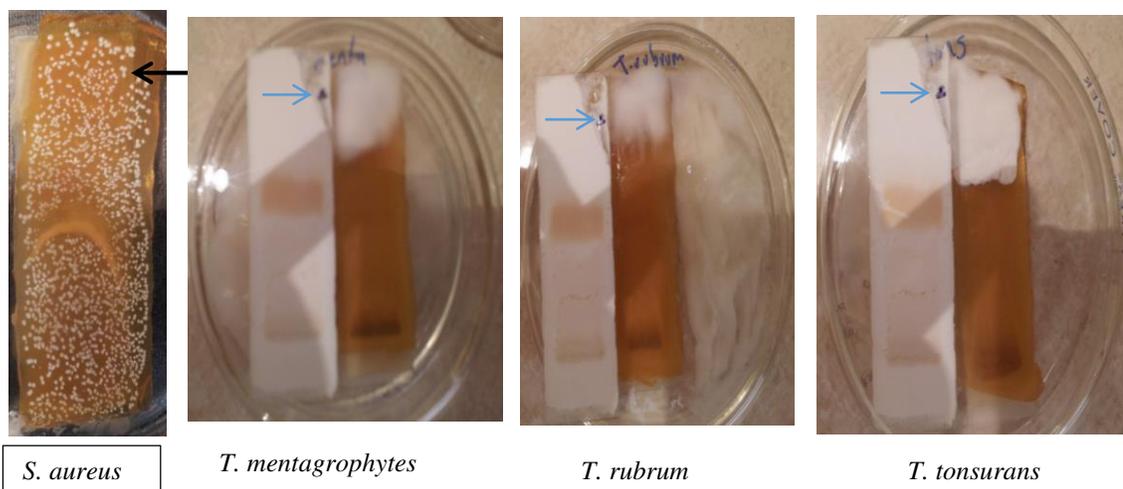


Figura 5. Bioautografías de los extractos de romero vs *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44 y de semilla de apio vs especies de dermatofitos. Las flechas indican el punto final de la elución.

Una vez determinados los sistemas de solventes para cada uno de los extractos se procedió a realizar la separación de los compuestos activos a través de Cromatografía en columna, para el extracto metanólico de romero se utilizó el sistema de solventes Hexano:acetona:metanol con 3 g de muestra adsorbida en sílica gel, de la cual se obtuvieron 9 fracciones descritas en la tabla 15.

Tabla 15. Fracciones recolectadas en la separación por columna del extracto metanólico de Romero.

Fracción	Sistema de solventes	mg	% de Rendimiento
1	Hx	180.3	6.01
2	Hx:Ac 9:1	198.4	6.61
3	Hx:Ac 8:2	633.1	21.10
4	Hx:Ac 7:3	598	19.93
5	Hx:Ac 6:4	360.1	12.0
6	Hx:Ac 1:1	396.6	13.22
7	Ac	483.7	16.12
8	Ac:MeOH 1:1	291	9.7
9	MeOH	370.5	12.35

Con estas fracciones se volvieron a realizar ensayos microbiológicos antimicrobianos, donde se observó actividad de la fracción 3 a la 9 como lo muestra la figura 6.

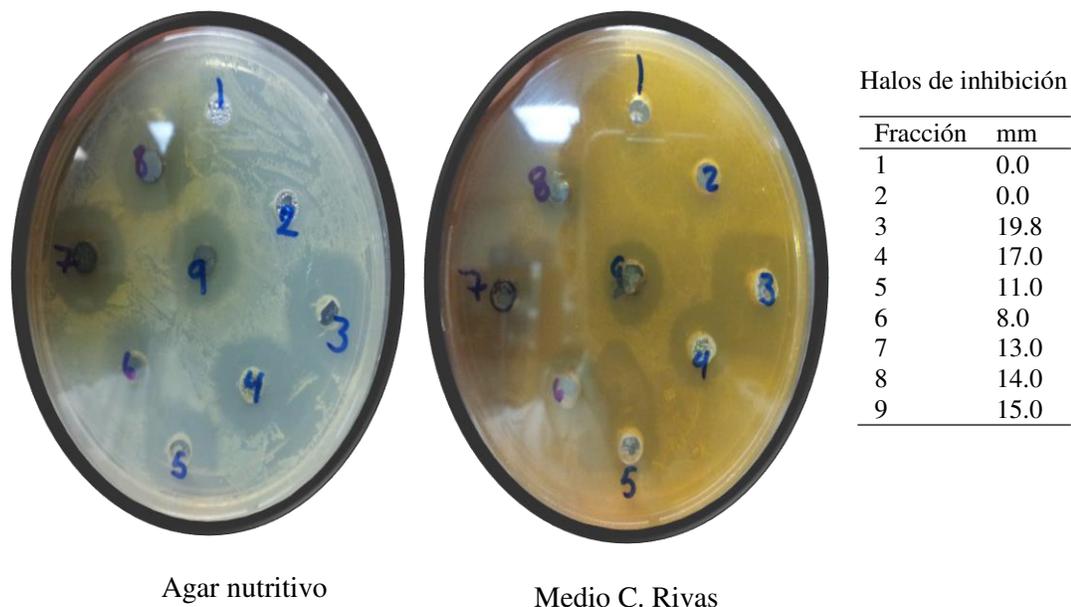


Figura 6. Ensayo de actividad antimicrobiana vs *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44 de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de Romero. n=4

Se decidió unir las fracciones 4 y 5; y de la 6 a la 9 de acuerdo al cromatograma mostrado para cada fracción bajo el sistema benceno:acetona 9:1 (Figura 7), esto con la finalidad de tener mayor cantidad de material, además se sometieron a una recristalización en frío con acetona, donde pudimos recuperar 300 mg de un polvo amorfo blanquecino como se muestra en la figura 8.

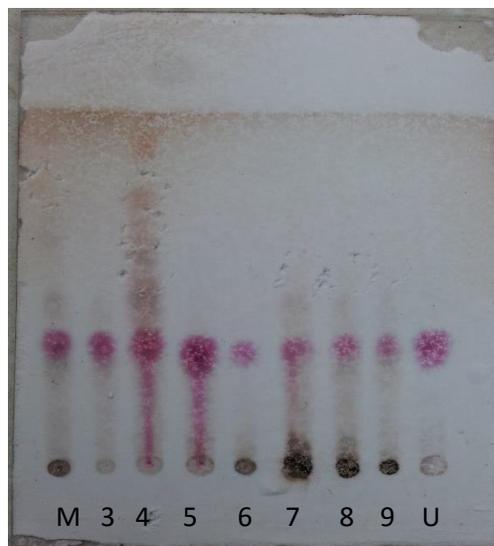


Figura 7. Cromatografía en capa fina de las fracciones 3-9 del extracto de *R. officinalis*, M= extracto metanólico crudo, U= Ácido ursólico

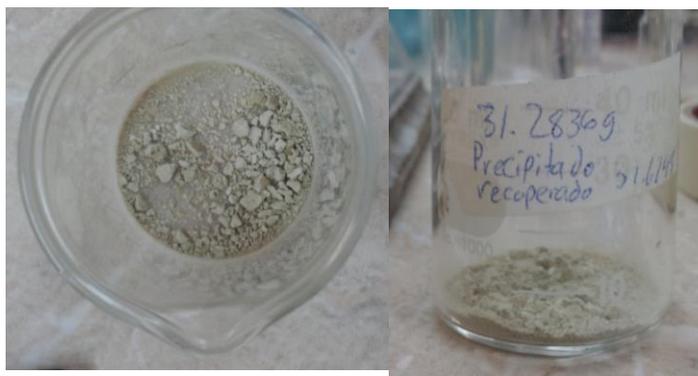


Figura 8. Polvo amorfo blanquecino recuperado de la unión de las fracciones 4 y 5 del extracto metanólico de Romero.

Este polvo se recuperó y se separó por medio de una cromatografía en columna Flash en un equipo ISOLERA SPEKTRA® BIOTAGE® con el sistema de solventes hexano:acetato de etilo, donde obtuvimos 17 fracciones las cuales de la 1 a la 3 se trataron como impureza 1, del 4 al 7 como compuesto 1, del 8 al 13 se denominó compuesto 2 y los restantes como impureza 2, debido al seguimiento que se hizo con el equipo con

longitudes de onda de 254 y 280 nm que nos proporcionó el software del mismo y que se puede observar en la figura 9.

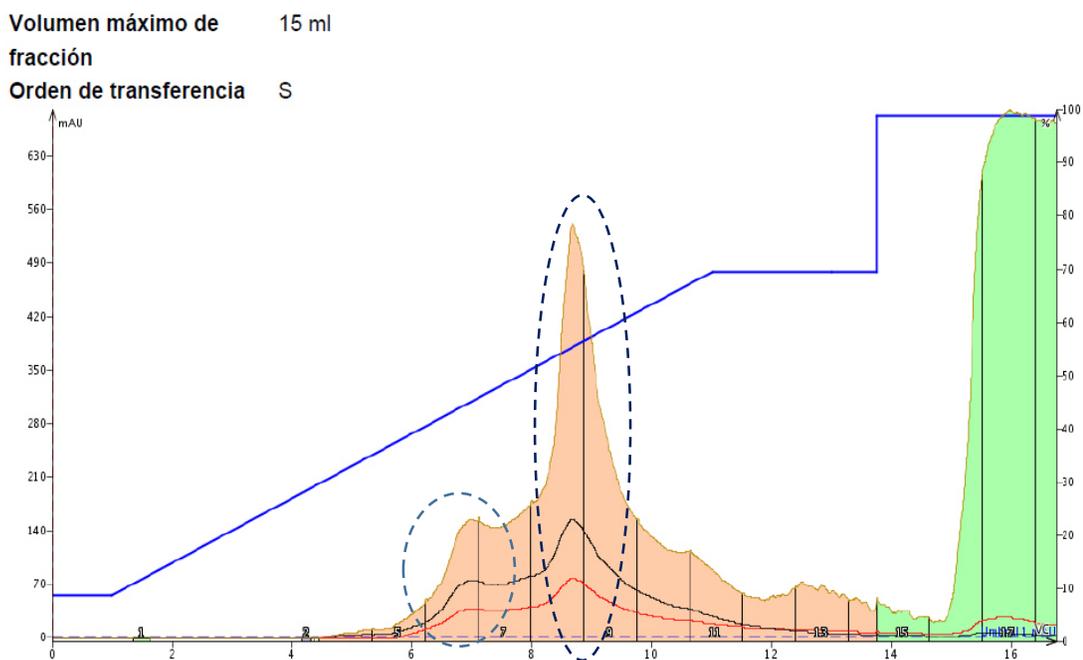


Figura 9. Espectrograma de elución de la separación del polvo amorfo recuperado del extracto metanólico de romero. Se pueden observar dos picos definidos identificados con líneas punteadas a longitudes de onda de 254 y 280 nm.

Se recuperaron 58.1 mg del compuesto 1 y 85.1 mg del compuesto 2, se realizó la TLC para rastrear la banda activa bajo el sistema benceno:acetona 9:1 y se reveló bajo vapores de Iodo y Cloruro de Cobalto, siendo el compuesto 2, donde se encontró la banda con el Rf de .42 comparando con el corrimiento del extracto metanólico directo, observando que con los vapores de yodo no aparece la banda del compuesto 1 y con el revelador de cloruro de cobalto si es revelada, lo que nos hace concluir que se trata de compuestos diferentes y de una naturaleza similar, ya que el revelador de cloruro de cobalto hace que aparezcan como se puede apreciar en la figura 10.

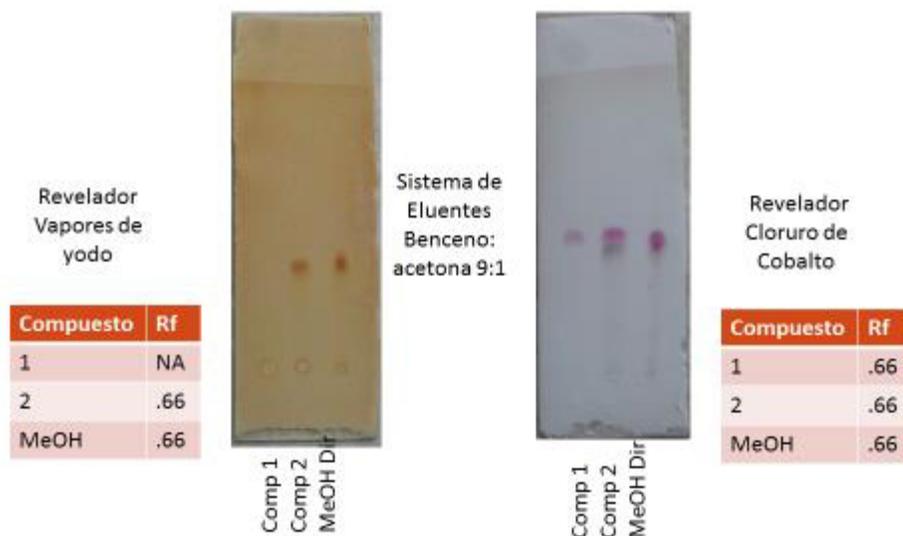
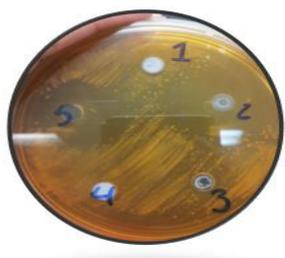


Figura 10. Cromatografía en capa fina de los compuestos separados por Cromatografía Flash en el equipo ISOLERA Spektra®. Nótese que los vapores de yodo no revelaron el compuesto 1, lo que sugiere que se tratan de diferentes compuestos.

Una vez obtenidas las cromatografías se decidió fraccionar el compuesto número dos bajo una partición soluble en metanol y una soluble el cloroformo, a las cuáles se les aplicó un ensayo biodirigido vs *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44, siendo la partición soluble en metanol la activa, como controles utilizamos las fracciones 4 y 5 de donde previamente se obtuvo éste compuesto aplicándole el mismo sistema de partición como lo muestra la figura 11.



Interpretación

Partición soluble en

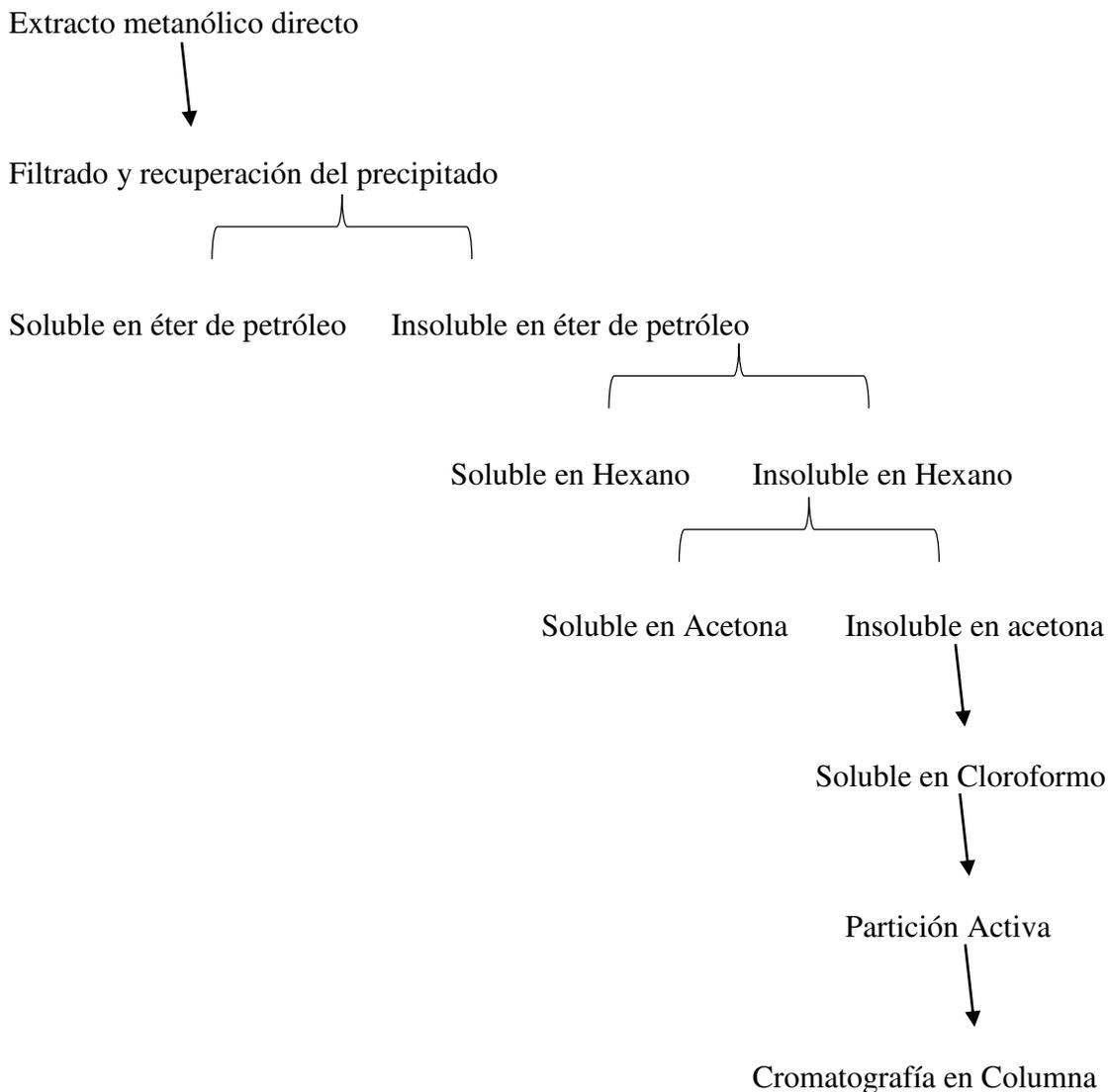
- 1.- CHCl₃ comp. 2
- 2.- MeOH comp. 2
- 3.- MeOH Fracciones 4 y 5
- 4.- CHCl₃ Fracciones 4 y 5
- 5.- Acetona fracciones 4 y 5

Inhibición (mm)

- 0
- 25
- 0
- 0
- 25

Figura 11. Evaluación de la actividad bactericida de la partición metanólica del compuesto 2 del extracto metanólico de romero, fracciones 4 y 5 en diferentes sistemas de partición.

Dado que la cantidad de muestra era muy poca para los análisis posteriores se llevaron a cabo diversas particiones del extracto metanólico directo para obtener mayor cantidad de muestra y llevarla a purificación y posterior identificación. Las particiones siguieron el siguiente orden:



La Cromatografía en Columna se realizó bajo el sistema Hexano:Acetato de Etilo en diferentes proporciones, siendo la proporción Hexano:acetato de etilo 7:3 donde se recuperó el compuesto activo (120 mg).

Se realizaron pruebas cualitativas de identificación parcial de grupos funcionales donde encontramos que la Prueba de Lieberman-Buchard (esteroles y triterpenos) resultó positiva para triterpenos observándose un color rojo. Figura 12.

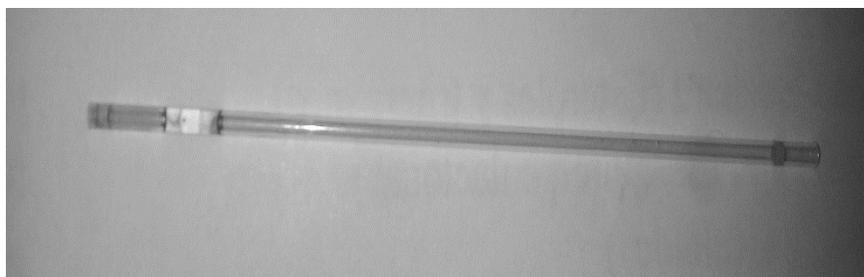


Figura 12. Prueba de Liebermann-Buchard, para triterpenos, del compuesto 2 del extracto metanólico de romero (positiva).

Ésta fracción se llevó a un análisis de espectroscopía infrarroja la cual se observa en el anexo 1 de este trabajo, obteniendo señales características para el grupo ácido carboxílico como se resume en la tabla 16.

Tabla 16. Señales características de grupos funcionales en el espectro infrarrojo del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.

No de señal	cm ⁻¹	Interpretación (Tensión en)
1	3435	Longitud del enlace O-H
2	2927	Longitud del enlace CH ₃ , CH ₂
3	1689	Longitud del enlace C=O
4	1457	Longitud del enlace C-OH

El análisis de resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN) mostró desplazamientos químicos que integran para 33 hidrógenos, 1 perteneciente a un ácido carboxílico $\delta = 10.45$ ppm, 2 hidrógenos olefínicos $\delta = 4.68, 4.61$ ppm respectivamente el espectrograma completo se encuentra en el anexo 2 y la tabla de desplazamiento químico se encuentra a continuación:

Tabla 17. Tabla de desplazamiento químico del ^1H -RMN del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.

Señal	δ ppm	Señal	δ ppm
a	10.45	q	1.55
b	4.68	r	1.54
c	4.61	s	1.4088
d	3.35	t	1.4002
e	3.16	u	1.38
f	3.13	v	1.37
g	2.25	w	1.3467
h	2.21	x	1.31
i	1.97	y	1.18
j	1.94	z	1.16
k	1.9	a'	1.12
l	1.89	b'	1
m	1.64	c'	0.98
n	1.62	d'	0.96
ñ	1.6	e'	0.9391
o	1.57	f'	0.9337
p	1.56		

La resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C -RMN) arrojó un espectro típico de compuestos triterpénicos, una señal de COOH en 178.65 ppm, dos señales de doble enlace en 154.32 y 105.17 ppm, respectivamente. Como se muestra en la tabla 18 sus desplazamientos químicos; el cromatograma se observa en el anexo 3.

Tabla 18. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.

# Señal	Desplazamiento ppm	# Señal	Desplazamiento ppm
1	178.65	16	37.7
2	154.32	17	34.06
3	105.17	18	33.01
4	78.69	19	31.44
5	56.28	20	28.9
6	56.15	21	28.81
7	53.97	22	28.23
8	48.67	23	26.34
9	46.9	24	21.56
10	42.96	25	19.2
11	40.48	26	17.79
12	39.58	27	16.73
13	39.41	28	16.02
14	38.12	29	15.88
15	37.84	30	16.45

El análisis DEPT (Anexo 4) demostró que la señal correspondiente al desplazamiento 105.17 ppm pertenece a un metileno CH_2 , lo que nos ayudó en la posterior identificación del compuesto.

El análisis bidimensional HSQC (anexo 5) nos muestra que la señal del metileno a 105.17 ppm se acopla con los hidrógenos de doble enlace con desplazamiento de 4.68 y 4.6 ppm, cómo se puede observar en la tabla de acoplamiento 19 y en el anexo 6.

Tabla 19. Análisis de acoplamiento de HSQC del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.

Desplazamiento ¹³C ppm	Desplazamientos ¹H ppm
105.17	4.68, 4.61
56.15	0.9337
48.62	1.62
46.90	3.35
39.41	0.96, 1.60
38.12	3.13
37.84	2.21, 1.57
34.06	1.4088, 1.3467
33.01	2.25, 1.55
31.44	1.97, 1.54
28.90	1.90, 1.31
28.81	1.18
28.23	1.89
26.34	0.98
21.56	1.4002, 1.16
19.20	1.64
17.79	1.56, 1.37
16.73	1.00
16.02	0.98
15.88	1.12
16.45	0.9391

Separación Cromatográfica del extracto de semilla de apio.

Una vez determinada la separación del extracto de semilla de apio por TLC y su bioautografía, por el sistema de solventes benceno:hexano 9:1, se decidió hacer una partición hexánica al extracto crudo metanólico y de esta partición se colocaron para su separación 7.1129 g y se separó por cromatografía en columna. De la elución total se recuperaron 98 fracciones las cuáles se resumen en la tabla 20.

Tabla 20. Fracciones colectadas del extracto metanólico de semilla de apio.

# colecta	mg	Solvente	Proporción
1	32.7	Hx	100
2	7.5	Hx	100
3	5.8	Hx	100
4	4.5	Hx	100
5	4.1	Hx	100
6	1.6	Hx:Ac	9.99 : 0.01
7	0.7	Hx:Ac	9.99 : 0.01
8	4.2	Hx:Ac	9.99 : 0.01
9	1	Hx:Ac	9.99 : 0.01
10	4.4	Hx:Ac	9.99 : 0.01
11	2.6	Hx:Ac	9.98 : 0.02
12	0.6	Hx:Ac	9.98 : 0.02
13	0.3	Hx:Ac	9.98 : 0.02
14	2.4	Hx:Ac	9.98 : 0.02
15	3	Hx:Ac	9.97 : 0.03
16	0	Hx:Ac	9.97 : 0.03
17	2.3	Hx:Ac	9.97 : 0.03
18	2	Hx:Ac	9.97 : 0.03
19	0.3	Hx:Ac	9.97 : 0.03
20	3	Hx:Ac	9.96 : 0.04
21	2.7	Hx:Ac	9.96 : 0.04
22	2	Hx:Ac	9.96 : 0.04
23	1.9	Hx:Ac	9.96 : 0.04
24	0.5	Hx:Ac	9.96 : 0.04
25	1.3	Hx:Ac	9.95 : 0.05
26	0.5	Hx:Ac	9.95 : 0.05
27	0.1	Hx:Ac	9.95 : 0.05
28	2.1	Hx:Ac	9.95 : 0.05
29	1.9	Hx:Ac	9.95 : 0.05

30	2.5	Hx:Ac	9.94 : 0.06
31	2.7	Hx:Ac	9.94 : 0.06
32	0.3	Hx:Ac	9.94 : 0.06
33	0	Hx:Ac	9.94 : 0.06
34	1	Hx:Ac	9.94 : 0.06
35	2.2	Hx:Ac	9.93 : 0.07
36	35.9	Hx:Ac	9.93 : 0.07
37	5.4	Hx:Ac	9.93 : 0.07
38	7	Hx:Ac	9.93 : 0.07
39	4.2	Hx:Ac	9.93 : 0.07
40	4.1	Hx:Ac	9.92 : 0.08
41	7.5	Hx:Ac	9.92 : 0.08
42	12.1	Hx:Ac	9.92 : 0.08
43	15.7	Hx:Ac	9.92 : 0.08
44	16.6	Hx:Ac	9.92 : 0.08
45	20.7	Hx:Ac	9.91 : 0.09
46	20	Hx:Ac	9.91 : 0.09
47	21.7	Hx:Ac	9.91 : 0.09
48	21.3	Hx:Ac	9.91 : 0.09
49	22.6	Hx:Ac	9.91 : 0.09
50	23.8	Hx:Ac	9.90 : 0.1
51	28.6	Hx:Ac	9.90 : 0.1
52	201.2	Hx:Ac	9.90 : 0.1
53	32.6	Hx:Ac	9.90 : 0.1
54	4.2	Hx:Ac	9.90 : 0.1
55	3.4	Hx:Ac	9 : 1
56	2.7	Hx:Ac	9 : 1
57	0.4	Hx:Ac	9 : 1
58	2	Hx:Ac	9 : 1
59	2.8	Hx:Ac	8 : 2
60	0.3	Hx:Ac	8 : 2

61	1.2	Hx:Ac	8 : 2
62	0.8	Hx:Ac	8 : 2
63	0.1	Hx:Ac	7 : 3
64	1.2	Hx:Ac	7 : 3
65	0.8	Hx:Ac	7 : 3
66	1.3	Hx:Ac	7 : 3
67	0.7	Hx:Ac	6 : 4
68	0	Hx:Ac	6 : 4
69	1.8	Hx:Ac	6 : 4
70	0.6	Hx:Ac	6 : 4
71	0	Hx:Ac	1 : 1
72	1.1	Hx:Ac	1 : 1
73	1.1	Hx:Ac	1 : 1
74	1.7	Hx:Ac	1 : 1
75	1.1	Hx:Ac	4 : 6
76	0	Hx:Ac	4 : 6
77	0.6	Hx:Ac	4 : 6
78	0	Hx:Ac	4 : 6
79	0	Hx:Ac	3 : 7
80	1.1	Hx:Ac	3 : 7
81	2.9	Hx:Ac	3 : 7
82	2.2	Hx:Ac	3 : 7
83	0	Hx:Ac	2 : 8
84	2	Hx:Ac	2 : 8
85	0.5	Hx:Ac	2 : 8
86	0	Hx:Ac	2 : 8
87	0	Hx:Ac	1 : 9
88	3.3	Hx:Ac	1 : 9
89	1.2	Hx:Ac	1 : 9
90	2.2	Hx:Ac	1 : 9
91	2.6	Ac	100

92	0.4	Ac	100
93	2.4	Ac	100
94	1.3	Ac	100
95	0	MeOH	100
96	0	MeOH	100
97	0	MeOH	100
98	0	MeOH	100

Se rastreó por TLC el bandeo similar al de la bioautografía encontrándose de la fracción 52 a la 59 (Figuras 13 y 14).



Figura 13. Cromatografía en capa fina de las fracciones (52 – 62) de la semilla de apio. Revelador Luz UV, sistema Benceno:Acetona 9:1.

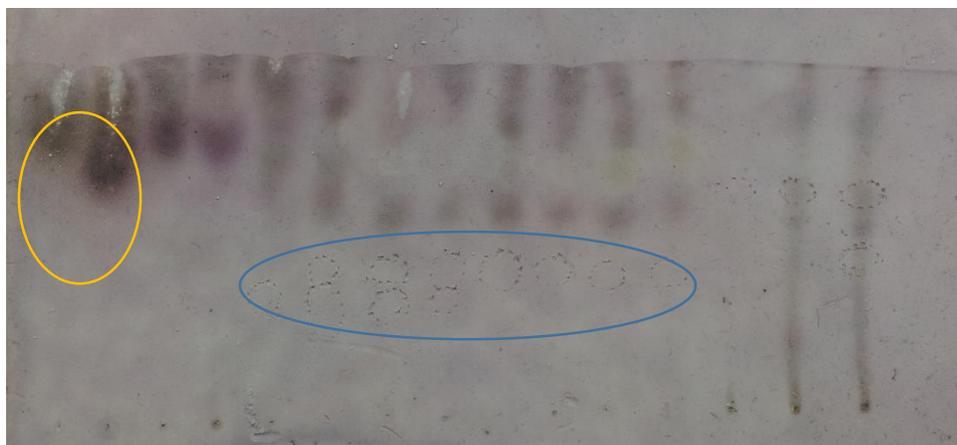


Figura 14. Cromatografía en capa fina de las fracciones (52 – 62) de la semilla de apio. Revelador Cloruro de Cobalto, sistema Benceno:Acetona 9:1.

Una vez identificadas las fracciones se realizó nuevamente los ensayos biodirigidos de la actividad antifúngica contra dermatofitos, siendo la fracción 52 la responsable de la actividad con un halo de inhibición = 30 mm. Como se observa en la figura 15.



Figura 15. Actividad antifúngica de las fracciones 52 – 59 del extracto de semilla de apio vs *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* y *T. rubrum* (n = 3).

Una vez determinada la fracción activa esta se sometió a una GC-MS dando como resultado el cromatograma situado en el anexo 6, donde se señala la presencia de 2 compuestos mayoritarios el primero con tiempo de retención de 12.97 min., y un patrón

de fragmentación: 190 (M^+), 133, 105, 77, 51 m/z (anexo 7), el segundo con tiempo de retención de 13.90 y patrón de fragmentación: 194 (M^+), 137, 108, 79 m/z (anexo 8).

Determinación de la capacidad antioxidante.

Para la estandarización del método de captación del radical ABTS $^{\bullet}$, se llevó a cabo la realización de la curva de calibración del control TROLOX y se obtuvo la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación como se muestra en la figura 16.

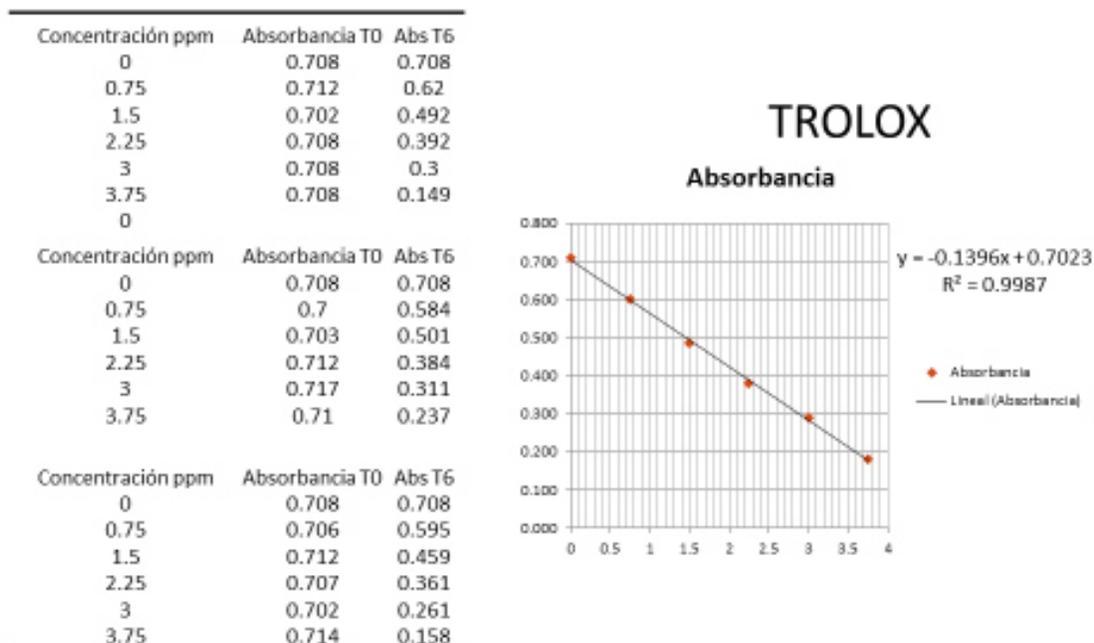


Figura 16. Curva de calibración de Trolox, con concentraciones de 3.75, 3, 2.25, 1.5, 0.75 ppm ($\mu\text{g/mL}$) y ecuación de la recta con su respectivo coeficiente de correlación ($n = 3$).

Los 20 extractos metanólicos fueron evaluados a concentraciones de 3.15, 6.25, 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$; a excepción de la gobernadora que fueron de: 0.6, 1.85, 5.5, 16 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Obteniéndose una tabla con rangos de inhibición del radical ABTS $^{\bullet}$, de los 20 extractos donde se observa que la que mayor actividad es del extracto de gobernadora con un rango de 9.69 - 98.54 % de inhibición. Tabla 21.

Tabla 21. Rangos de % de Inhibición del radical ABTS* de los extractos metanólicos.

Planta	% de Inhibición	Planta	% de Inhibición
Chaparro	4.32 - 46.89	Cola de caballo	2.50 - 19.07
Amargoso			
Manzanilla	11.51 - 94.37	Pingüica	3.99 - 37.53
Eucalipto	18.86 - 98.25	Apio	1.37 - 14.31
Alpistle	1.39 - 20.89	Neem	10.01 - 56.83
zacate limón	4.57 - 35.23	Pasiflora	13.92 - 33.40
Hinojo	4.61 - 40.51	Romero	14.75 - 98.90
Gordolobo	5.30 - 74.03	Hierba dulce	25.60 - 97.28
Zapote blanco	5.29 - 45.43	Valeriana	15.12 - 42.00
Tila	33.01 - 75.58	Cuachalalate	21.43 - 100
Nogal	32.37 - 98.18	Gobernadora	9.69 - 98.54

n = 3

Dados los resultados del % de inhibición el análisis de Probit mediante el programa estadístico SPSS® dieron como resultado las IC₅₀ para cada uno de los extractos siendo los de gobernadora, hierba dulce y nogal los que mostraron menor concentración como se puede observar en la tabla 22.

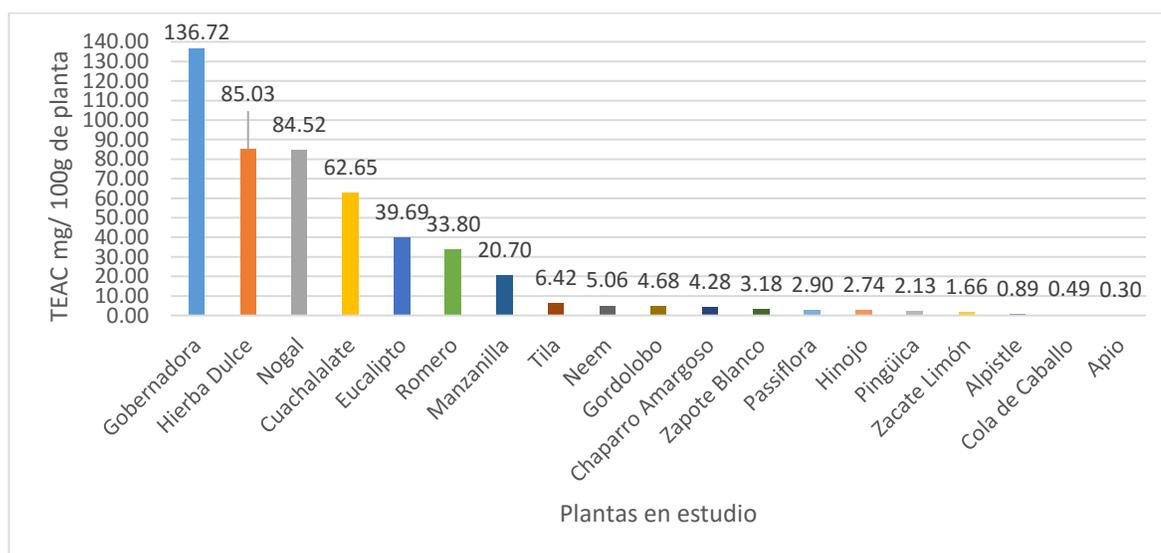
Tabla 22. Determinación de la IC₅₀ para los extractos metanólicos.

Muestra	IC₅₀ µg/mL	SD	Muestra	IC₅₀ µg/mL	SD
Gobernadora	1.67	0.012	Neem	45.12	1.313
Trolox	2.28	0.178	Gordolobo	51.91	17.116
Hierba Dulce	2.68	0.086	Chaparro	53.86	6.930
			amargoso		
Nogal	2.70	0.052	Zapote Blanco	71.72	2.845
Cuachalalate	3.64	0.159	Pasiflora	79.00	6.787
Eucalipto	5.75	0.316	Hinojo	83.99	9.381
Romero	6.90	1.303	Pingüica	107.56	7.697

Manzanilla	11.18	1.682	Zacate limón	138.25	13.474
Tila	36.76	7.773	Alpistle	258.01	28.724
Neem	45.12	1.313	Cola de caballo	464.04	27.229
			Apio	768.17	9.592

SD = Desviación estándar; n= 3

Con los datos obtenidos de la IC₅₀ se pudo calcular el TEAC para cada extracto. Como puede observarse en la gráfica 1. El de mayor actividad fue el extracto de gobernadora con 136.72, seguido de los extractos de Hierba dulce y Nogal con actividades de 85.03 y 84.52, respectivamente; el que menor actividad presentó fue el extracto metanólico de semilla de apio con un TEAC = 0.3.



Gráfica 1. Determinación de la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) de los extractos metanólicos.

Determinación de la CMI y CMF.

El compuesto 2 del extracto metanólico de romero mostró una CMI de 725 µg/mL vs *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44 mientras que el extracto metanólico de semilla de

apio tuvo una MIC de 1.4 mg/mL, *T. tonsurans* fue resistente al control Ketokonazol 0.5 mg/mL (figura 17), La CMF para el extracto metanólico de semilla de apio fue de 2.8 mg/mL para *T. rubrum* y de 1.4 mg/mL para *T. tonsurans* y *T. mentagrophytes* (figura 18).

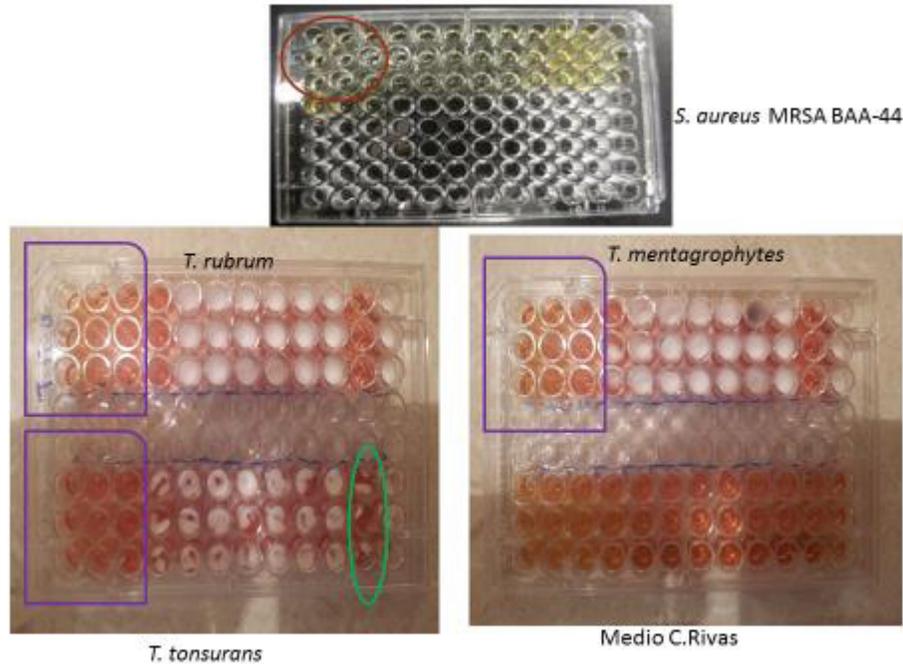


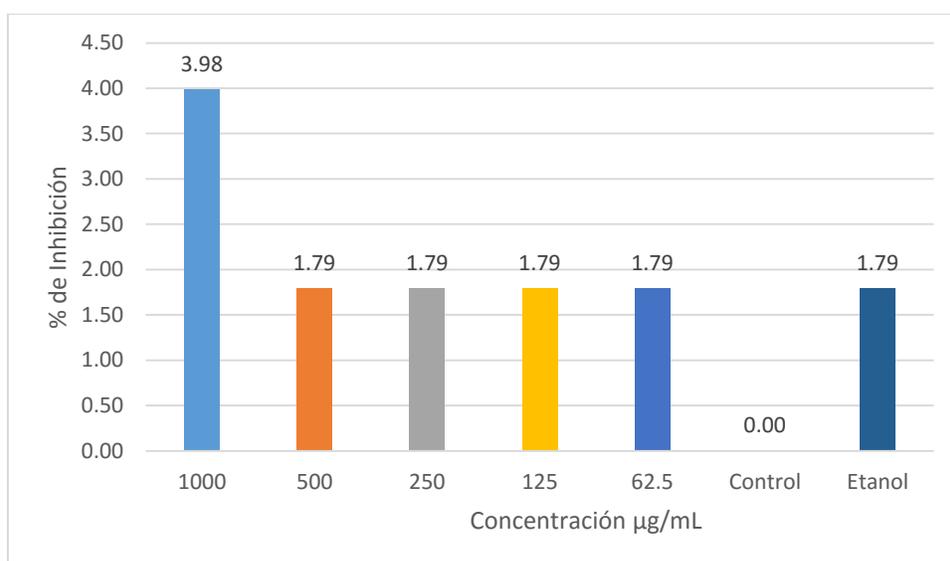
Figura 17. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria en la parte superior observamos el compuesto 2 del extracto de romero contra *S. aureus* MRSA y en la parte inferior el efecto del extracto metanólico de semilla de apio contra dermatofitos del género *Trichophyton*.



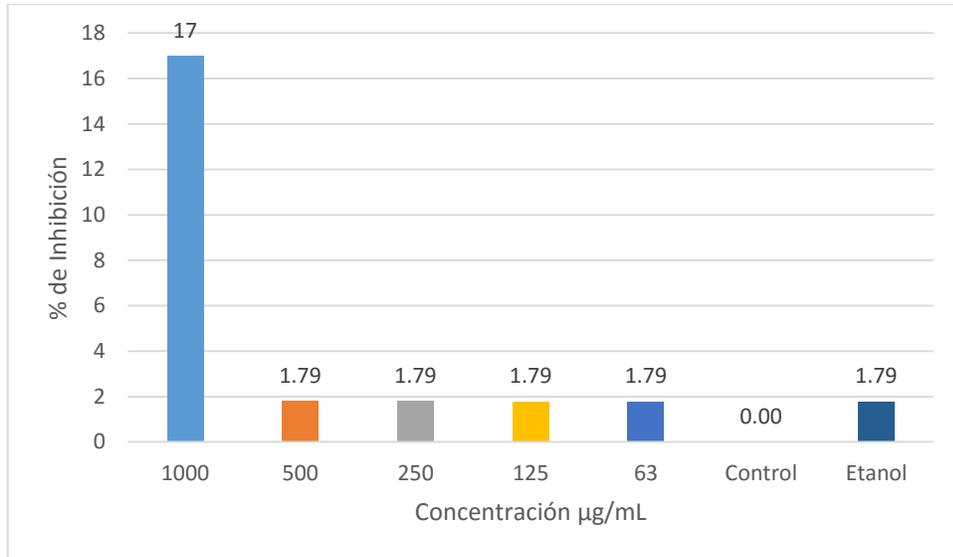
Figura 18. Concentración Mínima Fungicida del extracto metanólico de semilla de apio.

Determinación de la citotoxicidad de los extractos.

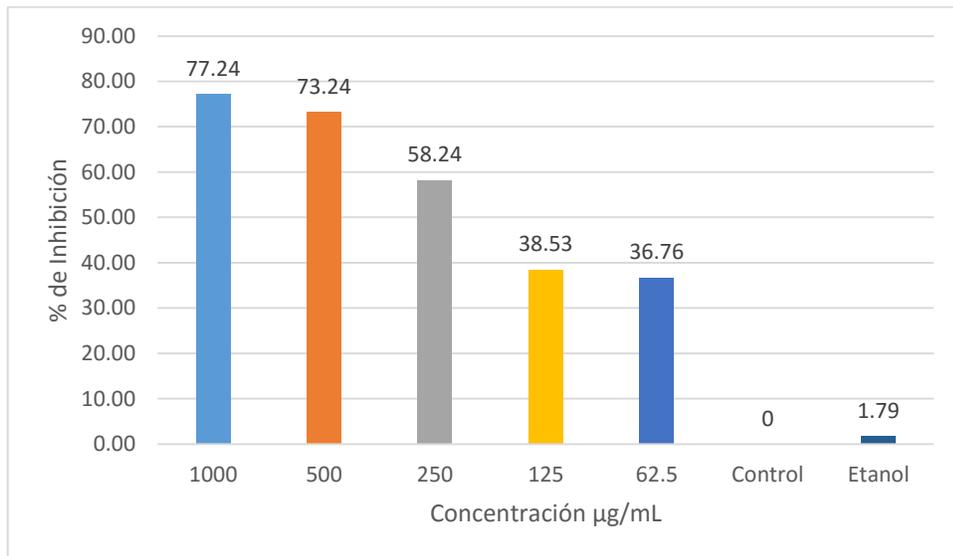
El ensayo de viabilidad celular con células Vero utilizando MTT, mostró que el compuesto 2 del extracto de romero tuvo un % de inhibición de crecimiento del 3.98 % a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (gráfica 2), mientras que la gobernadora presentó un 17 % de inhibición a la misma concentración (gráfica 3). El extracto de semilla de apio fue el que mayor % de inhibición mostró 36.76 % en la dosis más baja, lo que sugiere que este extracto a la concentración administrada es citotóxico (gráfica 4).



Gráfica 2. Efecto inhibitorio de las dosis del compuesto 2 del extracto de romero frente a la línea celular Vero. Control = Medio DMEM, Control negativo = Medio DMEM + Etanol 1%.



Gráfica 3. Efecto inhibitorio de las dosis del extracto metanólico de gobernadora frente a la línea celular Vero. Control= Medio DMEM, Control negativo = Medio DMEM + Etanol 1%.



Gráfica 4. Efecto inhibitorio de las dosis del extracto metanólico de semilla de apio frente a la línea celular Vero. Control = Medio DMEM, Control negativo = Medio DMEM + Etanol 1%.

DISCUSIÓN.

El uso de las plantas por el hombre, no sólo se arraiga como alimento, sino que, a lo largo del tiempo han llegado hasta nosotros diversos usos que han acompañado a la mejora de la calidad de vida. De las plantas podemos obtener gran cantidad de recursos, como fibras, colorantes, materia prima para construcción, resinas, aceites, extractos o infusiones con actividad farmacológica, entre otros. En este trabajo nos enfocamos precisamente a estos últimos recursos que poseen alguna actividad farmacológica, los cuáles se han utilizado desde tiempos remotos. Las culturas han ido transmitiendo éste conocimiento de generación en generación, la ciencia actual lo llama conocimiento etnobotánico, coloquialmente se le reconoce como “los remedios de la abuela” (Edelsztein 2011). Trabajos anteriores han evaluado un grupo de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana y fueron dirigidos hacia los campos de la agricultura en forma de nematicidas y plaguicidas, utilizando extractos hexánicos, acetónicos, etanólicos, metanólicos y acuosos, con concentraciones efectivas desde el 1 al 5 %. (Ramírez Moreno *et al.* 2001; Galicia *et al.* 2008). La relevancia de este trabajo es potenciar el uso de las plantas para combatir enfermedades de importancia médica como lo son las micosis y abre un panorama para fortalecer las terapias de patente existentes, además de ofrecer, en algunos casos como el de la hierba dulce o la manzanilla, que poseen adicionalmente capacidad de capturar radicales libres (Pereira *et al.* 2009) formados por el estrés oxidativo de enfermedades crónico-degenerativas.

La resistencia a los antibióticos constituye un problema serio de salud pública en el mundo, el cual se ha agudizado durante los últimos años, especialmente en los países subdesarrollados donde su uso indiscriminado ha propiciado la aparición de cepas bacterianas multiresistentes a éstos (Madigan *et al.* 2009).

Estudios anteriores de extractos de plantas refieren algunas cepas de importancia clínica que son protagonistas de las principales infecciones oportunistas intrahospitalariamente podemos mencionar a (Oluwatuyi *et al.* 2004) que reporta actividad bactericida con el extracto clorofórmico de las partes aéreas de *R. officinalis* (romero) contra *S. aureus* con mecanismo de bomba efflux tipo NorA; al igual que (Bocanegra-García *et al.* 2009) cuyo trabajo evaluó los extractos metanólicos y

clorofórmicos de *L. tridentata* (gobernadora); y además (Tohidpour *et al.* 2010) reporta actividad en el aceite esencial de *E. globulus* (eucalipto) todos ellos contra bacterias que presentan resistencia múltiple a antibióticos, en este trabajo evaluamos 20 extractos de plantas de las cuáles 10 presentan actividad antibacterial; para bacterias de referencia con resistencia tenemos al extracto de Nogal (*C. illinoensis*) contra *P. aeruginosa* ATCC-27853 que por primera se reporta en este trabajo, también como los de romero (*R. officinalis*) y gobernadora (*L. tridentata*) con reportes anteriores y nuevamente por primera vez reportamos la actividad para los extractos de cola de caballo (*E. robustum*), hierba dulce (*S. rebaudiana*) y chaparro amargoso (*C. texana*) en contra de *S. aureus* MRSA ATCC BAA-44. De igual forma los extractos que fueron activos para los aislados clínicos de *S. aureus* romero, cola de callo, gobernadora y chaparro amargoso, así mismo reportamos por primera vez que los extractos de zacate limón (*C. citratus*), cola de caballo y cuachalalate (*A. adstringens*) presentan la actividad contra *A. baumannii*.

Para la molécula aislada e identificada del extracto de romero con una CMI de 725 $\mu\text{g/mL}$ que concuerda con lo reportado (Wang *et al.* 2016), con CMI > 128 $\mu\text{g/mL}$. los datos obtenidos de los análisis espectroscópicos de la molécula bioactiva se compararon con la literatura y encontramos que correspondía al ácido betulínico (Peng *et al.* 1998; Adesanwo *et al.* 2013). Confrontando nuestros resultados con: la prueba cualitativa para la detección de esteroides y triterpenos Liebermann-Burchard que produjo un color rojo es positiva para triterpenos (Zaluski *et al.* 2011); el espectro infrarrojo nos dio señales en 3 400 que muestra la tensión de la longitud del enlace O-H y 1 689 cm^{-1} característico del grupo carbonilo C=O (Wade Jr 2004). Los análisis de RMN dieron información necesaria para la interpretación como se había mencionado al comparar con la literatura (Razboršek *et al.* 2007) los cuales mencionan tres compuestos de naturaleza ácida triterpénica que son: ácido oleanólico, ursólico y betulínico. Figura 19

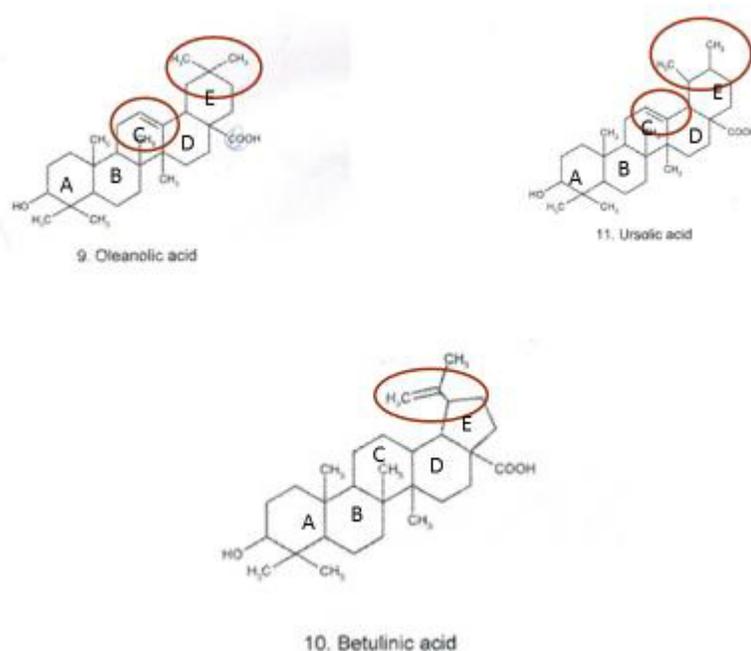


Figura 19. Comparación de los ácidos triterpénicos aislados del romero y sus principales diferencias.

Tanto el ácido oleanólico y el ursólico presentan insaturación en el anillo C lo que representa tener un grupo CH (metino) y un C cuaternario, este último no se observa en el análisis DEPT, esto nos dirige hacia el ácido betulínico que presenta la insaturación fuera del sistema de anillos como una sustitución; el sistema tendría nuevamente un C cuaternario y una señal para el grupo metileno (CH_2). Cómo se pudo observar en los anexos 2, 3 y 4 ésta señal aparece con un desplazamiento de 105.17 ppm (región de alquenos) que el análisis DEPT revela que corresponde precisamente a un grupo metileno, para comprobar si esta presunción era correcta el análisis de HSQC demostró que existe acoplamiento entre la señal de 105.17 ppm (^{13}C -RMN) con las señales de 4.68 y 4.61 ppm (^1H -RMN) correspondientes a hidrógenos geminales en la región de alquenos, es de considerarse que al compararlo con la literatura coincide para el ácido betulínico (Peng *et al.* 1998).

Diferentes extractos de *Apium graveolens* (apio) han sido reportado con actividad fungicida para hongos fitopatógenos, de los géneros *Rizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria* (éter de petróleo: 100 µg/mL) y *Uromyces* (extracto acuoso: 1 g/100 mL). En esta investigación el extracto metanólico fue activo contra hongos dermatofitos de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum* (Umit *et al.* 2009; Liu *et al.* 2012). Otro estudio indicó que el aceite esencial de semilla de apio por extracción supercrítica con CO₂ posee actividad contra especies de *Candida* y algunas especies de dermatofitos reportando la presencia de sedanólido, neocnidilido y neofitadieno con CMI de 0.16-0.32 µL/mL por el método de macrodilución (Marongiu *et al.* 2013). En este trabajo utilizamos un extracto metanólico y obtuvimos una CMI de 1.4 mg/mL, por el método de microdilución, con una separación por cromatografía en columna de una fracción activa con el uso de una técnica clásica, debemos recordar que al tratarse de aceites esenciales la densidad es directamente proporcional a la cantidad de materia presente en la técnica de macrodilución; por otra parte revisando la literatura, encontramos que los compuestos con tiempo de retención de 12.97 y 13.90 son los ya reportados en la semilla de apio neocnidilido y el 3-butilftalido, esta conclusión se dio a través de la comparación de los patrones de fragmentación de estos compuestos, también refieren que son los mismos responsables de la actividad fungicida (Mhadhebi *et al.* 2014).

La capacidad antioxidante de la gobernadora es debida a la presencia del ácido nordihidroguayarático (NDGA) y la actividad antifúngica también a la presencia de lignanos (500 µg/mL sobre *Aspergillus spp.*).(Lambert *et al.* 2002) Sin embargo existen reportes de que el NDGA presenta niveles de toxicidad a 50 µM (0.015118 g/L) (Arteaga *et al.* 2005); en el extracto evaluado de gobernadora obtuvimos una CI₅₀ de 0.00166 g/L (1.6 µg/mL), esta concentración es menor que la reportada.

Después de una búsqueda en las principales bases de datos (EBSCO, NCBI) de estas 20 plantas los resultados nos indican que es la primera vez que se reportan a Tila (*Tilia platyphyllos*), Nogal (*Carya illinoensis*), Hierba dulce (*Stevia rebaudiana*), Valeriana (*Valeriana ceratophylla*), Cola de caballo (*Equisetum robustum A. Br*) y al Hinojo (*Verbascum thapsus*) con actividad antifúngica sobre dermatofitos, lo que es una contribución al uso etnobotánico.

CONCLUSIÓN.

Se obtuvieron los extractos de las 20 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, obteniendo el mayor rendimiento de 58.82 % para la manzanilla y el menor de 3.42 % para el alpiste.

Al menos 10 de los extractos mostraron actividad contra bacterias de importancia clínica, 7 de éstos (nogal, romero, cola de caballo, eucalipto, chaparro amargoso, neem y hierba dulce) frente a organismos resistentes a antibióticos. Reportamos por primera vez actividad del extracto de nogal vs *P aeruginosa*; cola de caballo, hierba dulce y chaparro amargoso vs *S. aureus* MRSA.

Trece de los 20 extractos (gobernadora, apio, tila, nogal, eucalipto, neem, valeriana, hinojo, manzanilla, cola de caballo, gordolobo, hierba dulce y cuachalalate) mostraron actividad contra dermatofitos de importancia clínica. Reportamos por primera vez actividad para los extractos de: tila, nogal, hierba dulce, valeriana, cola de caballo e hinojo.

Se aisló e identificó el compuesto 2 del extracto de romero, como ácido betulínico con actividad bactericida contra *S. aureus* MRSA con una CMI de 725 µg/mL y no presentó citotoxicidad frente a la línea celular Vero.

Se determinó de la fracción 52, los compuestos 3-butilftalido y neocnidilido del extracto metanólico de semilla de apio, como responsable de la actividad biológica vs dermatofitos de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum* con una CMI 1.4 mg/mL.

La capacidad de captación de radicales libres (antioxidantes) fue mayor para los extractos de gobernadora, hierba dulce y nogal con una CI_{50} = 1.67, 2.68 y 2.70 µg/mL respectivamente. La gobernadora fue mayor un 36 % respecto al control positivo (TROLOX).

La citotoxicidad de los extractos frente a células Vero a una concentración de 1000 µg/mL: para gobernadora una inhibición del 17 % (citotoxicidad ligera); para el extracto de semilla de apio una inhibición del 78.22 % (citotoxicidad severa) y para el compuesto 2 que corresponde al ácido betulínico fue de 3.98 % (no citotóxico).

PERSPECTIVAS.

Con el desarrollo de este trabajo se abren horizontes para el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades que aquejan al hombre, por lo tanto es relevante continuar con la búsqueda de la(s) molécula(s) responsables de la actividad biológica de las plantas en estudio, que reportamos por primera vez. Es conocido que la medicina tradicional es utilizada a la par con los medicamentos de patente, por lo que la validación de la actividad y la identificación de dichas moléculas tendrá un gran impacto para las futuras investigaciones ya que si conocemos las fuentes y además las moléculas bioactivas, podremos tener acceso a la modificación y/o síntesis de nuevas estructuras con mayor actividad. Por lo tanto el uso de las plantas como fuente de nuevas moléculas es ya una línea de investigación con creciente demanda, debido a diferentes factores que han modificado la resistencia de los microorganismos aunado a los daños producidos por el estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abbo A, et al. 2007. Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26(11), pp.793-800.
- Abou-Gazar H, et al. 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, 65(17), pp.2499-2505.
- Adesanwo J, Makinde O, Obafemi C. 2013. Phytochemical analysis and antioxidant activity of methanol extract and betulinic acid isolated from the roots of *Tetracera potatoria*. *Journal of Pharmacy Research*, 6(9), pp.903-907.
- Ali N, et al. 2012. Anthelmintic and relaxant activities of *Verbascum Thapsus* Mullen. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), p.29.
- Alia C. 2009. Diagnóstico microbiológico. Identificación y antibiograma, p.36.
- Ali-Shtayeh M, Ghdeib S. 1999. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42, pp.665-672.
- Ammerman NC, Beier-Sexton M, y Azad AF. 2008. Growth and maintenance of vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology*, (SUPPL. 11).
- Appelbaum PC. 2007. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45 Suppl 3, pp.S165-S170.
- Aprotosoai AC, et al. 2008. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 112(3), pp.832-836.
- Araújo CR, et al. 2009. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(1), pp.9-12.
- Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), pp.231-239.

- ASOCAE ONGD. 2010. Plantas medicinales, Especies y Propiedades, Tilo (*Tilia platyphyllos*). Available at: ww.asocae.org [Accedido mayo 3, 2010].
- Barros L, et al. 2009. Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), pp.2458-2464.
- Barrow G, Feltham R. 2003. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria.*,
- Bartlett J. 2008. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Top HIV Med*, 16(5), pp.151-155.
- Benachour A, et al. 2009. Identification of secreted and surface proteins from *Enterococcus faecalis*. *Canadian journal of microbiology*, 55(8), pp.967-74.
- Bocanegra-Garcia V, et al. 2009. The bioactivity of plant extracts against representative bacterial pathogens of the lower respiratory tract. *BMC research notes*, 2, p.95.
- Bonifaz A. 2012. *Micología Médica Básica* 4.^a ed., México: McGraw Hill.
- Bush K, Jacoby G, Medeiros A. 1995. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), pp.1211-1233.
- Bush K, Miller GH. 1998. Bacterial enzymatic resistance: beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current opinion in microbiology*, 1, pp.509-515.
- Calzado-Flores C, et al. 2002. Estudio morfológico preliminar de los efectos producidos por la *Castela texana* en un modelo de animales experimentales. En VII Foro Regional de Investigación en Salud del IMSS Región Norte. p. 73.
- Camacho-Ramírez RI, et al. 2002. Epidemiología de las infecciones nosocomiales en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 22(4), pp.200-205.
- Castillo-Juárez I, et al. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from

- Amphipterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology, 114(1), pp.72-77.
- CDC Department of Health and Human Services. 2005. Community-associated MRSA information for clinicians. Available at: <http://www.cdc.gov> [Accedido agosto 9, 2010].
- Chávez P. 2004. Infecciones intrahospitalarias ¿Qué ha pasado durante 23 años? *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24, pp.89-92.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline M26-A.,
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 28(16), p.52.
- Cockerill FR, et al. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition,
- CONABIO. 2009. Malezas de México. Available at: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/matricaria-recutita/fichas/ficha.htm> [Accedido agosto 17, 2015].
- Costa EV, et al. 2011. *Rosmarinus officinalis* L.: chemical modifications of the essential oil and evaluation of antioxidant and antimicrobial activity. *Natural product communications*, 4(7), pp.907-912.
- Cunha BA. 2015. *Acinetobacter*. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/236891-overview> [Accedido febrero 22, 2016].
- D'Sousa' Costa CO, et al. 2015. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, 11(43), pp.607-614.

- Deurenberg RH, et al. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(3), pp.222-35.
- Díaz-Ramos RD, et al. 1999. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud Pública de México*, 41(1), pp.12-17.
- Doctorfungus.org. 2010. *M. nanum*. Available at: <http://www.doctorfungus.org> [Accedido mayo 2, 2010].
- Dou J, et al. 1996. A new quassinoid from *Castela texana*. *Journal of Natural Products*, 59(1), pp.73-76.
- Drummond AJ, Waigh RD. 2000. The development of microbiological methods for phytochemical screening. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 4, pp.143-152.
- Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), pp.1628-1635.
- Edelsztein V. 2011. Los remedios de la Abuela. Mitos y verdades de la medicina casera. 1a ed. S. Ve, ed., Buenos Aires.
- Estrada-Salas PA, et al. 2014. Characterization of antidiabetic and antihypertensive properties of canary seed (*Phalaris canariensis* L.) peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(2), pp.427-433.
- Fernández-Torres B, et al. 2001. In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), pp.2524-2528.
- Fonseca FN, Tavares MF, Horváth C. 2007. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), pp.390-399.

- Forero Gómez J. 2002. Beta Lactamasas de Espectro Extendido en Pediatría. Revista Colombiana de Pediatría, 37(4), pp.12-15.
- Galicia A, et al. 2008. In Vitro Nematocidal Activity of Plant Extracts of Mexican Flora against *Haemonchus contortus* Fourth Larval Stage. Animal Biodiversity and Emerging Diseases. Ann. N.Y. Acad. Sci, Dec(1149), pp.158-160.
- García D, Crespo M, Rodríguez Ferradá CA. 2003. Obtención y control de calidad de la tintura homeopática de *Passiflora incarnata* L . Revista Cubana de Plantas Medicinales , 8 , p.0.
- Ghimeray AK, et al. 2009. Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A . Juss grown in foothills of Nepal. Journal of Biotechnology, 8(13), pp.3084-3091.
- Gobernado M. 2005. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. Rev Esp Quimioterap, 18(2), pp.115-117.
- Guerra-Ordóñez M, et al. 2004. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Rev cubana plant med, 9(2).
- Gutiérrez A, Del Río JC. 2001. Gas chromatography/mass spectrometry demonstration of steryl glycosides in eucalypt wood, kraft pulp and process liquids. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 15(24), pp.2515-2520.
- Hernández Díaz L, Rodríguez Jorge M. 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 6(2), pp.44-47.
- Hernández Guevara C, et al. 1991. Electroforesis unicelular como Bioindicador De Antigenotoxicidad inducida. En 2° Congreso Nacional de Química Médica. p. 9.
- Hernández-Morales A. 2004. Actividad Biocida de las Alcamidas Aisladas de *Heliopsis longipes* y *Acmella radicans* Contra *Plasmodium falciparum*. Instituto Politécnico Nacional.
- Hou AJ, et al. 2000. Hydrolyzable tannins and related polyphenols from *Eucalyptus globulus*. Journal of Asian natural products research, 2(3), pp.205-12.

- Karvouniaris M, Makris D, Zakynthinos E. 2010. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections: pneumonia. *Microbiology Research*, 2(1), pp.15-21.
- Khattab SN, et al. 2015. Production and physicochemical assessment of new stevia amino acid sweeteners from the natural stevioside. *Food Chemistry*, 173, pp.979-985.
- Kimpe A, et al. 2003. Phenotypic and genetic characterization of resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus gallolyticus* strains isolated from pigeons and humans. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 9 Suppl 1, pp.S35-S38.
- Koch S, et al. 2004. Enterococcal infections: Host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *En Vaccine*. pp. 822-830.
- Kühn I, et al. 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment--a European study. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), pp.133-145.
- De La Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Shahidi F. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), pp.152-162.
- Laboratorio de Estrés Oxidativo EOX. 2008. ESTRÉS OXIDATIVO. Available at: http://estresoxidativo.com/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=17&Itemid=27 [Accedido febrero 22, 2016].
- Lambert JD, et al. 2005. Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, 66(7), pp.811-815.
- Lambert JD, et al. 2002. Nordihydroguaiaretic acid: Hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicon*, 40(12), pp.1701-1708.
- Leblebicioglu H, et al. 2007. Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *The Journal of hospital infection*, 65(3), pp.251-7.
- Liu T, et al. 2012. Phytopathogenic Fungal Inhibitors from Celery Seeds. *Natural product*

- communications, 7(7), pp.889-890.
- Low DE, et al. 2001. Clinical Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Geographic Resistance Patterns of Enterococci: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases* , 32 (Supplement 2), pp.S133-S145.
- Madigan MT, et al. 2009. Brock. *Biología de los microorganismos*. En Pearson Educación, ed. Brock. *Biología de los microorganismos*. p. 592.
- Mandel G, Douglas R, Bennett J. 2002. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. Tomo I* 5.^a ed., Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Marongiu B, et al. 2013. Isolation of the volatile fraction from *Apium graveolens* L. (Apiaceae) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: chemical composition and antifungal activity. *Natural product research*, 27(17), pp.1521-1527.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105), pp.797-799.
- Masteikova R, et al. 2008. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 65(5), pp.577-583.
- McKay DL, Blumberg JB. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy research : PTR*, 20(7), pp.519-530.
- Melgarejo López N, Álvarez Bustamante G, Alonso Abad A. 2004. Guía práctica para la prescripción fitoterapéutica en la Atención Primaria de Salud . *Revista Cubana de Medicina General Integral* , 20 , p.0.
- Mhadhebi L, et al. 2014. Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Aqueous Extracts of Three Mediterranean Brown Seaweeds of the Genus *Cystoseira*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 13(1), pp.207-220.
- Miguel MG, et al. 2010. *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 5(2),

pp.319-328.

- Miller S, Haber WA, Setzer WN. 2009. Chemical composition of the leaf essential oil of *Casimiroa edulis* La Llave & Lex. (Rutaceae) from Monteverde, Costa Rica. *Nat.Prod.Comm.*, 4(3), pp.425-426.
- Molina GJD, Garza MH. 1999. Vigilancia de infecciones nosocomiales en un hospital de cardiología. *Salud Pública de México*, 41(1), pp.26-31.
- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. 2000. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), pp.513-522.
- Murray BE, Moellering RC. 1979. Aminoglycoside-Modifying Enzymes Among Clinical Isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* (*Herellea vaginicola*): Explanation for High-Level Aminoglycoside Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(2), pp.190-199.
- Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65(24), pp.3249-3254.
- Oprea SF, et al. 2004. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(4), pp.626-630.
- Osawa K, et al. 1995. Eucalyptone from *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry*, 40(1), pp.183-184.
- Panusa A, et al. 2014. UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling of *Arctostaphylos pungens* and *Arctostaphylos uva-ursi*. A comparative study of phenolic compounds from leaf methanolic extracts. *Phytochemistry*.
- Peng C, et al. 1998. Computer-assisted structure elucidation: Application of CISOC-SES to the resonance assignment and structure generation of betulinic acid. *Magnetic Resonance In Chemistry*, 36(4), pp.267-278.
- Pereira RP, et al. 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical research*, 34(5), pp.973-983.

- Phillipson JD. 1994. Natural products as drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(SUPPL. 1), pp.17-19.
- Ponce De León S, et al. 1999. Infecciones nosocomiales: Tendencias seculares de un programa de control en Mexico. *Salud Publica de Mexico*, 41(SUPPL. 1), pp.5-11.
- Qimin L, et al. 1991. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 562(1-2), pp.435-446.
- Ramírez Moreno L, et al. 2001. Evaluación del efecto insecticida de extractos de plantas sobre *Leptophobia aripa* Elodia. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 60, pp.50-56.
- Razboršek MI, et al. 2007. Determination of major phenolic acids, phenolic diterpenes and triterpenes in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by gas chromatography and mass spectrometry. *En Acta Chimica Slovenica*. pp. 60-67.
- Re R, et al. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), pp.1231-1237.
- Rello J, et al. 1999. Variations in etiology of ventilator-associated pneumonia across four treatment sites: Implications for antimicrobial prescribing practices. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(2), pp.608-613.
- Reyes-López M, et al. 2005. The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicology in Vitro*, 19(1), pp.91-97.
- Riss TL, Niles AL, Minor L. 2004. *Cell Viability Assays Assay Guidance Manual*. Assay Guidance Manual, pp.1-23.
- Rivas Morales C, et al. 2007. Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico.
- Robbins KS, et al. 2014. Separation and characterization of phenolic compounds from U.S. pecans by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry, 62(19), pp.4332-4341.
- Rodríguez-Álvarez Y, et al. 2014. Application of a colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for the evaluation of IL-15 antagonists. *Biotecnología Aplicada*, 31, pp.291-296.
- Rosenthal VD, et al. 2006. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Annals of Internal Medicine*, 145(8), pp.582-591.
- Salipante SJ, Barlow M, Hall BG. 2003. GeneHunter, a transposon tool for identification and isolation of cryptic antibiotic resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), pp.3840-5.
- Sandrea-Toledo L, et al. 2007. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela. (Spanish). Extended-Spectrum β -Lactamase Producers Isolated from Hemocultures at the University Hospital in Venezuela. (English), 35(1), pp.15-25 The extended-spectrum β -Lactamase (ESBL) is a.
- Selvey LA, Whitby M, Johnson B. 2000. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: is it any worse than nosocomial methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Infection control and hospital epidemiology*, 21(10), pp.645-8.
- Shahid M, Malik A, Sheeba. 2003. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC beta-lactamases isolated from hospitalised burn patients in a tertiary care hospital of North India. *FEMS microbiology letters*, 228, pp.181-186.
- Shankar V, et al. 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*, 67(1), pp.193-200.
- Shukla S, et al. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), pp.2338-2343.
- Silva J, et al. 2001. Outbreak of infection with extended-spectrum ??-lactamase-producing

- Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), pp.3193-3196.
- Silverstein-M R, Webster-X F, Kiemle-J D. 2005. Spectrometric Identification of Organic Compounds. *Organic Chemistry*, pp.1-550.
- Steinmetz W. Lin A. 2009. NMR studies of the conformation of the natural sweetener rebaudioside A. *Carbohydr Res.*, 344(18), pp.2533-2538.
- Taboas-Guimerans S. 2005. Curso Fitoterapia. Curso Fitoterapia. Available at: <http://www.mailxmail.com/curso-fitoterapia>.
- Takagi T, Iida T. 1980. Antioxidant for fats and oils from canary seed: Sterol and triterpene alcohol esters of caffeic acid. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 57(10), pp.326-330.
- Tigrero J, Landázuri P. 2009. Aplicaciones de la Stevia rebaudiana. En P. A. Landázuri & J. O. Tigrero, eds. *Stevia rebaudiana Bertoni, una planta medicinal*. Sangolquí, Ecuador: ESPE., pp. 32-33.
- Tohidpour A, et al. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2), pp.142-145.
- Turker AU, Camper ND. 2002. Biological activity of common mullein, a medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2-3), pp.117-125.
- Umit A, Kadir I, Ozgur AK. 2009. Antifungal activity of aqueous extracts of spices against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Allelopathy Journal*, 24(1), pp.207-214.
- UNAM. 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Available at: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7917> [Accedido mayo 3, 2010].
- Vargas Olmos R, Salgado Camarillo J. 2004. Agentes causales de neumonía nosocomial en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Central Militar. *Rev Sanid Milit Mex*, 58(3), pp.188-192.

- Villa-Ruano N, et al. 2013. Anti-Lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biological Research*, 46, pp.153-160.
- Villegas MV, Hartstein AI. 2003. Acinetobacter outbreaks, 1977-2000. *Infection control and hospital epidemiology*, 24(4), pp.284-295.
- Wade Jr L. 2004. Espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas. En Pearson Educacion, ed. *Química Orgánica*. Madrid, p. 490 ss.
- Wang CM, et al. 2016. Antibacterial and Synergistic Activity of Pentacyclic Triterpenoids Isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules*, 21(2), p.139.
- Zaluski D, Smolarz HD, Szpilewska M. 2011. Eleutherosides in Aerial Parts of *Eleutherococcus* Species Cultivated in Poland. *Journal of AOAC International*, 94(5), pp.1422-1426.
- Zhou K, et al. 2009. Triterpenoids and flavonoids from celery (*Apium graveolens*). *Journal of Natural Products*, 72(9), pp.1563-1567.

RESUMEN BIOGRÁFICO

David Gilberto García Hernández

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SEPARACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA

Campo de Estudio: Química de Productos Naturales

Datos Personales: Nacido en H. Matamoros, Tamaulipas el 11 de Junio de 1986, hijo de Tomás Gilberto García Olvera y María de Jesús Hernández Rodríguez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009 con mención honorífica. Tesis de licenciatura: 1er lugar en el Concurso Estatal de Investigación en Salud Nuevo León, en el área: I. Ciertas Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Diciembre 2009

Experiencia Profesional: Docente de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas desde 2013 hasta esta fecha.

Trabajo Científico

Actividad fungicida, antioxidante e identificación de los compuestos más activos de 20 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana

Fungicide, antioxidant activity and more active compounds identification of 20 plants used in the mexican traditional medicine.

David Gilberto García Hernández¹, Azucena Oranday Cárdenas¹, María Julia Verde Star¹, Ramiro Quintanilla Licea¹, Catalina Leos Rivas,¹ Elvira Garza González², Catalina Rivas Morales¹.

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina UANL.

Resumen:

En éste trabajo se evaluó la actividad fungicida sobre dermatofitos, antioxidante en función de la capacidad de atrapar el radical ABTS e identificación de compuestos activos de extractos metanólicos de 20 plantas medicinales; siendo los extractos más activos: el de semilla de apio, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1.4 mg/mL y una concentración mínima fungicida (CMF) de 2.8 mg/mL contra todas las especies de dermatofitos evaluados, excepto *T. rubrum*; y el de gobernadora como antioxidante con una $CI_{50} = 1.67 \mu\text{g/mL}$ y una actividad equivalente de Trolox (TEAC) = 136.72 mg Trolox 100 g de planta. Se identificaron de la semilla de apio dos compuestos por cromatografía de gases acoplada a masas neocnidilido y 3-butiltalido.

Abstract

This work evaluated the fungicidal activity of dermatophytes, antioxidant depending on the capacity to catch the ABTS radical and identification of active compounds from methanolic extracts of 20 medicinal plants; being the most active extracts: that of celery seed, with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 1.4 mg/mL and a minimal fungicide concentration (MFC) 2.8 mg/mL against all species of dermatophytes except *T. rubrum* and the Governor as an antioxidant with an $IC_{50} = 1.67 \mu\text{g/mL}$. The activity equivalent of Trolox (TEAC) was 136.72 mg Trolox 100 g of plant. We identified two compounds in celery seed by gas chromatography coupled to mass neocnidilide and 3-butylphthalide.

Palabras clave: Dermatofitos, ABTS, TEAC, Fungicida, Antioxidante.

Keywords: Dermatophytes, ABTS, TEAC, fungicidal and antioxidant

Correspondencia:

Dra. Catalina Rivas Morales
Laboratorio de Química Analítica.
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
Tel. 81 14939311 Ext.Fax 81 83525011
E-mail: catalinarivas@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 5 de agosto de 2015

Fecha de recepción de modificaciones: 2 de noviembre de 2015

Fecha de aceptación: 10 de diciembre de 2015

Introducción

Por cientos de años, las plantas han constituido la base de los sistemas de medicina para mantener la salud e incrementar la calidad de vida. Las plantas acumulan sustancias o metabolitos secundarios que pueden ser extraídas y utilizadas como material para aplicaciones científicas, tecnológicas y comerciales, especialmente aquellos compuestos con actividad farmacológica considerados de importancia biológica e industrial.¹ Esto conlleva al estudio profundo de estos organismos, llevando a cabo el aislamiento, purificación y evaluación de la actividad biológica que éstos puedan poseer. En México el uso de la medicina tradicional no se arraiga sólo a las comunidades indígenas cómo se pensaba, sino que existe una amplia tradición oral que se ha transmitido de generación en generación conocida coloquialmente como "remedios de la abuela",² que es la aplicación de éste conocimiento etnobotánico. Nuestro país cuenta con una gran diversidad de plantas aunado a la intrusión de nuevas especies, las cuales ofrecen una oportunidad para ser una alternativa a la creciente resistencia de los agentes etiológicos de las enfermedades, con una disminución en el costo-beneficio. Se ha realizado una gran cantidad de investigaciones que se enfocan en extraer los metabolitos secundarios con diferentes sistemas de disolventes orgánicos, de acuerdo a la naturaleza de los compuestos.³ Los extractos polares han sido ampliamente utilizados en investigaciones a nivel mundial por su gran capacidad de extracción, siendo el metanol un agente de extracción de menor costo y que puede retirarse con procesos sencillos para garantizar concentraciones no tóxicas para el organismo. La naturaleza de los metabolitos secundarios presentes en las plantas es extensa, así podemos mencionar algunos de ellos que han presentado actividad biológica importante, tales como: alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas. Entre los usos tradicionales de las plantas medicinales están: desórdenes gastrointestinales, problemas respiratorios, carminativos, emenagogos.^{4,5,6,7} La importancia de los productos naturales se basa, no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos, sino la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevos fármacos, los cuales no deben ser más tóxicos para el ser humano que para el microorganismo a tratar.⁸ Existe conocimiento empírico tradicional del uso de las plantas medicinales, sin embargo es necesaria la investigación científica para conocer las características fitoquímicas y sus aplicaciones farmacológicas, ya que la combinación de tratamientos alternativos y de patente en algunas enfermedades han sido efectivas,^{9,10} por tal motivo en el año 2010 a través de la Dirección de Medicina Tradicional y Desarrollo Intercultural de la Secretaría de Salud (México) encabezada por el Dr. José Alejandro Almaguer G., se inició una investigación de más de 60 plantas en nuestra región donde son ampliamente utilizadas,

de estas se nos asignaron 20 las cuales son utilizadas en el norte de México.

Por lo antes mencionado el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad fungicida, antioxidante e identificar moléculas biológicamente activas, para validar su uso en la medicina tradicional y ofrecer un soporte a los tratamientos de patente.

Materiales y Métodos

Microrganismos

Se seleccionaron dermatofitos de importancia médica:

Trichophyton rubrum, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*.

Microsporium canis, *M. nanum* y *M. gypseum*.

Éstos fueron obtenidos de aislados clínicos de pacientes del Hospital Universitario, Dr. José Eleuterio González, de la UANL.

Material Vegetal

Se seleccionaron 20 plantas medicinales de uso tradicional de la casa comercial PACALLI®; las cuáles se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Plantas seleccionadas para este estudio

Nombre Científico	Nombre común	Nombre Científico	Nombre común
<i>Apium graveolens</i> L.	Apio	<i>Carya illinoensis</i>	Nogal
<i>Castela texana</i>	Chaparro amargoso	<i>Passiflora incarnata</i>	Pasiflora
<i>Equisetum robustum</i> A. Br.	Cola de caballo	<i>Arctostaphylos pungens</i>	Pingüica
<i>Amphiplerygium adstringens</i>	Cuschalalate	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	<i>Tilia platyphyllos</i>	Tila
<i>Larrea tridentata</i>	Gobernadora	<i>Valeriana ceratophylla</i>	Valeriana
<i>Verbascum thapsus</i>	Gordolobo	<i>Cymbopogon citratus</i>	Zacate limón
<i>Stevia rebaudiana</i>	Hierba dulce	<i>Casimiroa edulis</i>	Zapote blanco
<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo	<i>Phalaris canariensis</i>	Alpiste
<i>Matricaria recutita</i>	Manzanilla	<i>Azadirachta indica</i>	Neem

Obtención de los extractos metanólicos

Se pesaron 30 g de cada una de las plantas en estudio y se sometieron a extracción continua en un equipo Soxhlet con metanol (CTR *scientific*) hasta extracción completa. Posteriormente se filtraron, se retiró el disolvente con un rotavapor (Bucchi), se determinó su rendimiento y se almacenaron en frascos, hasta su uso.

Actividad fungicida

Ésta se determinó por el método de difusión en placa con medio de cultivo sólido C. Rivas¹¹ con algunas modificaciones. Primero en las placas con el medio de cultivo se inocularon por picadura con las cepas en estudio y se incubaron a 25 ± 2 °C por 15 d

para la formación de macro y microconidias, éstas se cosecharon y se ajustaron a una solución de 2×10^4 conidias/mL en agua destilada.¹² 100 μ L de esta solución se inocularon en la placa y se extendió con una asa Drigralsky, posteriormente se hicieron pocillos en la placa de 6 mm de diámetro, en las cuales se depositaron 20 μ L del extracto metanólico crudo de cada una de las plantas en estudio a una concentración de 100 mg/mL, se utilizó como control positivo ketokonazol (0.5 mg/mL) y como control negativo metanol. Luego se llevaron a incubación a 25 ± 2 °C en atmósfera húmeda por 7 d. Al concluir el período de incubación se observó la presencia de un halo de inhibición alrededor del pocillo y se determinó la actividad fungicida, todos los ensayos se corrieron por triplicado.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF)

Para la determinación de la CMI se siguió el protocolo del método de microdilución establecido por la NCCLS M38-A para hongos filamentosos con una modificación.¹³ Se preparó el inóculo de conidias a una densidad óptica de 0.08-0.1 UA, se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific) a 625 nm, de esta solución se tomó una alícuota y se hizo una dilución 1:50 en medio líquido C. Rivas, hasta una concentración final del extracto de 5.8 a 0.01 mg/mL y 0.5 μ g/mL de Ketoconazol y metanol como controles positivo y negativo, respectivamente. En una placa de 96 pocillos se colocaron 100 μ L de la solución diluida de conidias más 100 μ L de la dilución de los extractos y controles. Posteriormente se incubaron a las mismas condiciones antes mencionadas por 7 d. Al término de éste se observaron los pocillos para verificar el crecimiento de los dermatofitos, se determinó como CMI la última concentración donde hay inhibición del crecimiento; de estos pocillos se tomó una asada y se inoculó en medio sólido C. Rivas y se incubó a las mismas condiciones por 7 d. Posteriormente se determinó la CMF que corresponde a la concentración donde no hay crecimiento.

Separación Cromatográfica

Los extractos que mostraron actividad biológica se separaron por cromatografía. Se preparó una columna cromatográfica (330 mm x 28 mm) empacada con sílica gel 60 G (Sigma-Aldrich) y se colocaron en la parte superior 7.11 g de extracto de semilla de apio adsorbida en sílica-gel. Se hizo pasar 25 ml de un sistema de disolventes de mayor a menor polaridad hexano:acetona:metanol, colectándose fracciones de 5 mL. De cada fracción se corrió una cromatografía en capa fina con el sistema benceno:hexano 9:1, posteriormente se esterilizaron con luz UV y se realizó una bioautografía para determinar la fracción activa. Ésta se separó y mediante cromatografía de gases acoplada a masas (Agilent Technologies) con las condiciones: Acarreador: He; Columna capilar HP-5 MS; 1 mL/min; Temperatura Inicial de 80 °C,

y se incrementa a 220°C/3 min, 300 °C/1 min; la temperatura del inyector fue de 230°C, volumen de inyección 1 μ L, la comparación se realizó con la base de datos Wiley Library y se identificó el compuesto responsable de la actividad.

Determinación de la Capacidad de captura de radicales libres

La determinación de captación del radical ABTS^{•+} se realizó por la técnica establecida por Re et al. 1999¹⁴ con algunas modificaciones. El radical ABTS^{•+} se formó tras la reacción de ABTS (Sigma-Aldrich, 7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.200 a 734 nm. Se colocaron 1980 μ L del radical libre en tubos de vidrio y se hicieron reaccionar con 20 μ L de las soluciones de los extractos a concentraciones de 3.15 a 50 μ g/mL; a excepción del extracto de gobernadora este fue de 0.6 a 50 μ g/mL. Se tomó lectura de la mezcla de reacción al minuto 1 y 6 a 734 nm, los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizó una curva de calibración con TROLOX® (Sigma-Aldrich) 15 mM a 3 mM (0.75 – 3.75 μ g/mL), se determinó el porcentaje de inhibición y con esos datos se calculó la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) por medio del paquete estadístico SPSS, después se determinó la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) según la siguiente fórmula:¹⁵

$$TEAC \left(TROLOX \frac{g}{100 \text{ planta}} = \frac{IC_{50} Trolox}{IC_{50} muestra} \right) \times 100$$

Resultados

Se utilizaron diferentes partes de la planta para la obtención de los extractos de acuerdo al uso tradicional de cada una, en la **Tabla 2** se muestra el rendimiento obtenido y la parte utilizada

Tabla 2. Rendimiento de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

Planta	Parte utilizada	% Rendimiento (p/p)	Planta	Parte utilizada	% Rendimiento (p/p)
Manzanilla	aérea	58.82	Pasiflora	aérea	25.89
Romero	aérea	45.33	Chaparro amargoso	aérea	19.76
Pingüica	fruto	41.6	Nogal	aérea	17.80
Gobernadora	aérea	37.63	Tila	aérea	17.07
Eucalipto	aérea	37.13	Apio	semilla	16.68
Hierba dulce	aérea	33.33	Hinojo	aérea	16.60
Gordolobo	aérea	32.25	Cola de caballo	aérea	14.96
Valeriana	aérea	32.07	Zapote blanco	aérea	14.59
Neem	aérea	27.40	Zapote limón	aérea	7.72
Cuchalalate	corteza	27.35	Alpiste	semilla	3.42

para la obtención de los extractos metanólicos, siendo el de la parte aérea de manzanilla la que produjo mayor rendimiento y la semilla de alpiste el de menor rendimiento.

En la **Tabla 3** se muestra la actividad fungicida de las plantas en estudio sobre el género *Microsporium*. Donde 6 plantas inhiben el crecimiento de *M. canis*, 10 el de *M. gypseum* y 6 el de *M. nanum*.

Tabla 3. Actividad fungicida de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre el género *Microsporium*.

Extracto (100 mg/ml)	Halo de inhibición (cm)	Microorganismo	Extracto (100 mg/ml)	Halo de inhibición (cm)	Microorganismo
Apio	2.5	<i>M. canis</i>	Cuschalalate	1.2	<i>M. gypseum</i>
Gobernadora	1.5	<i>M. canis</i>	Neem	1.0	<i>M. gypseum</i>
Neem	1.0	<i>M. canis</i>	Nogal	1.0	<i>M. gypseum</i>
Tila	1.0	<i>M. canis</i>	Hierba dulce	1.0	<i>M. gypseum</i>
Hierba dulce	1.0	<i>M. canis</i>	Valeriana	1.0	<i>M. gypseum</i>
Valeriana	1.0	<i>M. canis</i>	Ketoconazol	4.0	<i>M. gypseum</i>
Ketoconazol	4.0	<i>M. canis</i>	Apio	1.5	<i>M. nanum</i>
Gobernadora	2.0	<i>M. gypseum</i>	Nogal	1.2	<i>M. nanum</i>
Apio	1.5	<i>M. gypseum</i>	Tila	1.2	<i>M. nanum</i>
Hinojo	1.5	<i>M. gypseum</i>	Gobernadora	1.2	<i>M. nanum</i>
Eucalipto	1.5	<i>M. gypseum</i>	Neem	0.9	<i>M. nanum</i>
Tila	1.3	<i>M. gypseum</i>	Hinojo	0.8	<i>M. nanum</i>

En la **Tabla 4** se muestra la actividad fungicida de las plantas en estudio sobre el género *Trichophyton*; donde 8 plantas inhibieron el crecimiento de *T. rubrum*, 4 el de *T. mentagrophytes* y 8 el de *T. tonsurans*.

Tabla 4. Actividad fungicida de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre el género *Trichophyton*.

Extracto (100mg/ml)	Halo de inhibición (cm)	Microorganismo	Extracto (100mg/ml)	Halo de inhibición (cm)	Microorganismo
Gobernadora	4.0	<i>T. rubrum</i>	Valeriana	1.0	<i>T. mentagrophytes</i>
Apio	2.5	<i>T. rubrum</i>	Ketoconazol	4.0	<i>T. mentagrophytes</i>
Tila	1.8	<i>T. rubrum</i>	Gobernadora	2.0	<i>T. tonsurans</i>
Nogal	1.4	<i>T. rubrum</i>	Apio	1.5	<i>T. tonsurans</i>
Eucalipto	1.2	<i>T. rubrum</i>	Manzanilla	1.3	<i>T. tonsurans</i>
Neem	1.2	<i>T. rubrum</i>	Cola de caballo	1.3	<i>T. tonsurans</i>
Valeriana	1.2	<i>T. rubrum</i>	Gordolobo	1.2	<i>T. tonsurans</i>
Hinojo	1.0	<i>T. rubrum</i>	Hinojo	1.2	<i>T. tonsurans</i>
Ketoconazol	4.0	<i>T. rubrum</i>	Romero	1.0	<i>T. tonsurans</i>
Apio	4.5	<i>T. mentagrophytes</i>	Valeriana	1.0	<i>T. tonsurans</i>
Gobernadora	3.5	<i>T. mentagrophytes</i>	Ketoconazol	3.0	<i>T. tonsurans</i>
Tila	1.5	<i>T. mentagrophytes</i>			

Como puede observarse en las Tablas 3 y 4 de las plantas en estudio las de mayor actividad fueron apio y gobernadora, debido a los pocos reportes de la primera en cuestión fungicida se decidió trabajar con la semilla de apio, al extracto metanólico de ésta, se le determinó la CMI y la CMF, dando como resultado 1.4 mg/mL y 2.8 mg/mL respectivamente, contra todos los

hongos evaluados excepto para *T. rubrum*, el extracto se sometió a separación cromatográfica en capa fina con sistema benceno:hexano 9:1 obteniendo 4 bandas observadas con luz UV y con revelador de cloruro de cobalto. Se calculó el frente de retención de las bandas, obteniendo los siguientes valores: $Rf_1 = 0.5$, $Rf_2 = 0.44$, $Rf_3 = 0.36$ y $Rf_4 = 0.16$. con las cromatoplasas se corrió la bioautografía, donde se observó inhibición en las bandas referidas (**Figura 1**) éste sistema condujo a utilizar un gradiente de solventes de baja polaridad para la técnica de cromatografía en columna del extracto crudo de semilla de

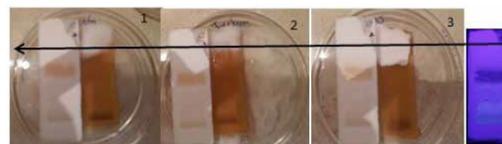


Figura 1. Bioautografía del extracto metanólico de la semilla de apio sobre diferentes especies de género *Trichophyton*. La línea negra indica el límite del eluyente benceno:hexano 9:1. Caja1 = *T. mentagrophytes*, Caja 2 = *T. rubrum*, Caja 3 = *T. tonsurans* y cromatografía revelada con luz UV.

apio donde se recolectaron 98 fracciones, a las cuales se les determinó nuevamente la actividad fungicida contra las especies de *Trichophyton*. Bajo el sistema hexano:acetona 9.9:0.1 se recuperaron la fracción 52 con una masa de 201.2 mg y la 53 con una masa de 32.6 mg que fueron las activas (**Figura 2**).

La fracción 52 de mayor actividad antifúngica se sometió a una cromatografía de gases acoplada a masas. Los picos de mayor

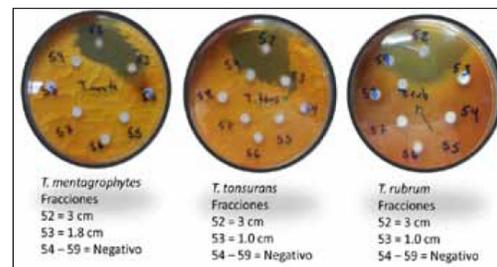


Figura 2. Actividad fungicida de las fracciones (52-59) de semilla de apio sobre diferentes especies del género *Trichophyton*. n = 3

abundancia que se obtuvieron en el cronograma corresponden según la base de datos a tujona ($Rt=9.77$ min), 3-butilftalido ($Rt=12.97$ min) y neocnidilido ($Rt=13.90$ min). **Figura 3**

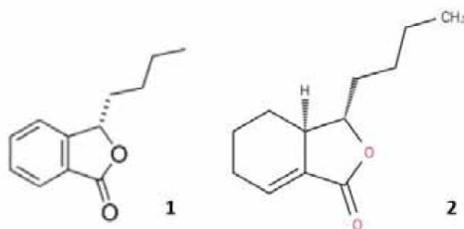


Figura 3. Estructura de 1) 3-Butilfitalido y 2) Neocnidilido

En el espectro de masas el compuesto con tiempo de retención 12.97 min mostró la siguiente fragmentación: 190(M⁺), 133, 105, 77, 51 m/z; el de tiempo de retención de 13.90 min mostró 194(M⁺), 137, 108, 79 m/z, comparando estos espectros de masas con la literatura,¹⁶ observamos que coinciden con el patrón de fragmentación del 3-butilfitalido y el neocnidilido respectivamente.

Tabla 5. Determinación de la CI₅₀ para la capacidad Antioxidante y Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) de las plantas en estudio.

Muestra	CI ₅₀ (µg/ml)	TEAC (mg Trolox 100 g muestra)	Muestra	CI ₅₀ (µg/ml)	TEAC (mg Trolox 100 g muestra)
Gobernadora	1.67 (±0.012)	136.72	Zapote Blanco	71.72(±2,845)	3.18
Hierba Dulce	2.68 (±0.086)	85.02	Pasiflora	79.00 (±6,787)	2.90
Nogal	2.70 (±0.052)	84.52	Hinojo	83.99 (±9,381)	2.74
Cuachalalate	3.64 (±0.159)	62.65	Valeriana	93.75 (±25,321)	2.57
Eucalipto	5.75 (±0.316)	39.69	Pingüica	107.56 (±7,697)	2.13
Romero	6.90 (±1.303)	33.80	Zacate Limón	138.25 (±13,474)	1.66
Manzanilla	11.18 (±1.682)	20.70	Alpiste	258.01 (±28,724)	0.89
Tila	36.76 (±7,773)	6.42	Cela Caballo	464.04 (±27,229)	0.49
Neem	45.12 (±1,313)	5.06	Apio	768.17 (±9,592)	0.30
Gordolobo	51.91 (±17,116)	4.68	Trolox (control)	2.28 (± 0.178)	
Chaparro Amargoso	53.86 (±6,930)	4.28			

En la **Tabla 5** se muestra la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las plantas en estudio. Se calculó la CI₅₀ mediante un análisis Probit con el paquete estadístico SPSS[®]. La Gobernadora fue la que mostró el mejor índice antioxidante resultando mayor que el control, los extractos fueron probados a concentraciones de 3.15 a 50 µg/mL y para la gobernadora de 0.6 a 50 µg/mL; a partir de éstos resultados se obtuvo la actividad equivalente de Trolox (TEAC).

Discusión

En este trabajo se realizó la evaluación fungicida y antioxidante de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana,

a las cuáles se les han atribuido muchos beneficios como diuréticos, carminativos, emenagogos, eméticos, contra enfermedades del sistema respiratorio, digestivo, circulatorio, óseo, entre otros.^{17,18,19,20} Trabajos anteriores han evaluado un grupo de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana y fueron dirigidos hacia los campos de la agricultura en forma de nematocidas y plaguicidas, utilizando extractos hexánicos, acetónicos, etanólicos, metanólicos y acuosos, con concentraciones efectivas desde el 1 al 5 %.^{21,22} La relevancia de este trabajo es potenciar el uso de las plantas para combatir enfermedades de importancia médica como lo son las micosis²³ y abre un panorama para fortalecer las terapias de patente existentes, además de ofrecer, en algunos casos como el de la hierba dulce o la manzanilla, que poseen adicionalmente capacidad de capturar radicales libres²⁴ formados por el estrés oxidativo de enfermedades crónico-degenerativas.

Diferentes extractos de *Apium graveolens* (apio) han sido reportado con actividad fungicida para hongos fitopatógenos, de los géneros *Rizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria* (éter de petróleo: 100 µg/mL) y *Uromyces* (extracto acuoso: 1 g/100 mL). En esta investigación el extracto metanólico fue activo contra hongos dermatofitos de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*.^{25,26} Otro estudio indicó que el aceite esencial de semilla de apio por extracción supercrítica con CO₂ posee actividad contra especies de *Candida* y algunas especies de dermatofitos reportando la presencia de sedanolido, neocnidilido y neofitadieno con CMI de 0.16-0.32 µL/mL por el método de macrodilución²⁷. Los ftálicos y sus correspondientes análogos hidratados se encuentran en una amplia variedad de la familia Apiaceae, estas moléculas son lactonas²⁸, y sirven como núcleo estructural de una variedad de compuestos más complejos, además sus derivados son utilizados en la síntesis de antineoplásicos y potenciadores en la quimioterapia y en el tratamiento y prevención de la *Diabetes mellitus*.²⁹ Estas investigaciones fundamentan nuestros resultados, ya que se encontraron este tipo de compuestos en *A. graveolens* y estos fueron responsables de la actividad fungicida. En este trabajo utilizamos un extracto metanólico y obtuvimos una CMI de 1.4 mg/mL, por el método de microdilución, cómo ya se mencionó son componentes de los aceites esenciales y su proceso de aislamiento es costoso, en nuestro trabajo pudimos obtener una fracción activa rica en estos compuestos mediante una técnica clásica de separación, lo que implica una ventaja en el costo-beneficio al no requerir de equipo de alta tecnología. Los compuestos neocnidilido y el 3-butilfitalido son las responsables de la actividad biológica fungicida¹⁵ y está reportado que la tujona está relacionada con efectos convulsivos.¹⁴ La capacidad antioxidante de la gobernadora es debida a la presencia del ácido nordihidroguayarático (NDGA) y la actividad antifúngica también a la presencia de lignanos (500 µg/mL sobre *Aspergillus spp.*)³⁰ Sin embargo existen reportes de que el NDGA presenta niveles de toxicidad a 50 µM (0.015118

g/L)³¹ y en el extracto probado de gobernadora tuvimos una CI₅₀ de 0.00166 g/L, esta concentración es menor que la reportada. Después de una búsqueda en las principales bases de datos (EBSCO, NCBI) de estas 20 plantas los resultados nos indican que es la primera vez que se reportan a Tila (*Tilia platyphyllos*), Nogal (*Carya illinoensis*), Hierba dulce (*Stevia rebaudiana*), Valeriana (*Valeriana ceratophylla*), Cola de caballo (*Equisetum robustum A. Br*) y al Hinojo (*Verbascum thapsus*) con actividad antifúngica sobre dermatofitos, lo que es una contribución a la validación científica de su uso etnobotánico.

Conclusión

En la evaluación de la actividad fungicida de los extractos metanólicos de las 20 plantas de la medicina tradicional mexicana estudiadas, al menos 8 de ellas mostraron actividad contra dermatofitos de importancia médica. Por primera vez se reporta actividad fungicida para: *T. platyphyllos*, *C. illinoensis*, *S. rebaudiana*, *V. ceratophylla*, *E. robustum* y *V. thapsus*. El extracto metanólico de semilla de apio, fue el que mostró mayor actividad fungicida en este estudio; la fracción 52 de este extracto mostró actividad contra dermatofitos de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*, con una CMI de 1.4 mg/mL y una CMF de 2.8 mg/mL, excepto *T. rubrum*. Se identificaron dos compuestos por CG-MS, que fueron 3-butilftalido y neocidilido. La mayor capacidad antioxidante de las plantas en estudio la presentaron gobernadora, hierba dulce y nogal con una CI50= 1.67, 2.68 y 2.70 µg/mL, respectivamente y un TEAC igual a 136.72, 85.02 y 84.52 (mg Trolox 100 g muestra) respectivamente; la gobernadora mostró una actividad superior en un 36% al control positivo (TROLOX).

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado bajo el registro 377431.

Referencias

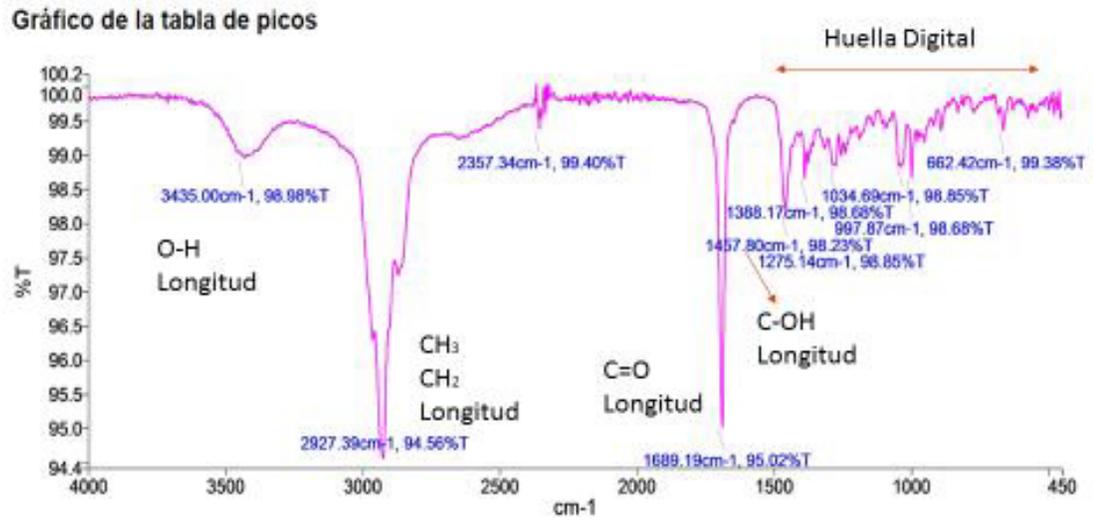
1. Hernández Morales A, Ramírez Chávez E, Gamiotea Turro D, Molina Torres J. Actividad antimicrobiana de *Heliopsis longipes* y *Acmella radicans*. CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. 2004. Irapuato Guanajuato, México. p 36.
2. Edelsztein V. Los remedios de la abuela: mitos y verdades de la medicina casera. 1a ed. Buenos Aires, Argentina: Siglo Veintiuno Editores; 2011 p 7.
3. Hernández Díaz L, Rodríguez JM. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. Rev. Cubana plant med 2001; May-Ago (2): 44-27
4. Zhou K, Zhao F, Liu Z, Zhuang Y, Chen L, Qiu F. Triterpenoids and flavonoids from celery (*Apium graveolens*). J Nat Prod 2009 Sep;72(9):1563-7

5. Zamora Natera F, García López P, Ruiz Lopez M, Salcedo Pérez E. Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (*Fabaceae*) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. Agrociencia 2008; Feb-Mar 42 (2):185-192.
6. Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). Phytochemistry 2003; Ago 63(7):795-801.
7. Guerra Ordóñez M, Rodríguez Jorge M, García Simón G, Llerena Rangel C. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. Rev cubana plant med 2004; 9(2)
8. Phillipson JD. Transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene Natural Products as drugs 1994; 88, supplement 1: 17-19.
9. Colucci R, Dragoni F, Conti R, Pisaneschi L, Lazzeri L, Moretti S. Evaluation of an oral supplement containing *Phyllanthus emblica* fruit extracts, vitamin E, and carotenoids in vitiligo treatment. Dermatol Ther. 2015 Jan-Feb;28(1):17-21.
10. Szczurko O, Boon HS. A systematic review of natural health product treatment for vitiligo. BMC Dermatol. 2008 May 22;8:2.
11. Rivas Morales C, Salinas Carmona MC, Galan Wong L, Medrano Roldán H. Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico. Título: No 252592 MPI MX/07/11/2007. 2007.
12. Rodrigues AC, Miranda CK, Lisboa FO, Soares AJ, Rodrigues SM. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in goiania, brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2009; 51(1):9-12
13. NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A. 2002.
14. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine 2007; May;26(9-10):1231-7.
15. Mhadhebi L, Mhadhebi A, Robert J, Bouraoui A. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects of aqueous extracts of three mediterranean brown seaweeds of the genus *Cystoseira*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2014 Winter;13(1):207-20.
16. Lachenmeier D W, Nathan Maister D, Breaux T A, Sohnius E, Kuballa T. Chemical composition of vintage prebanabsinhe with special reference to thujone, fenchone, pinocampnone, methanol, copper, and antimony concentrations. J. Agric. Food Chem 2008 May 14;56(9):3073-81.

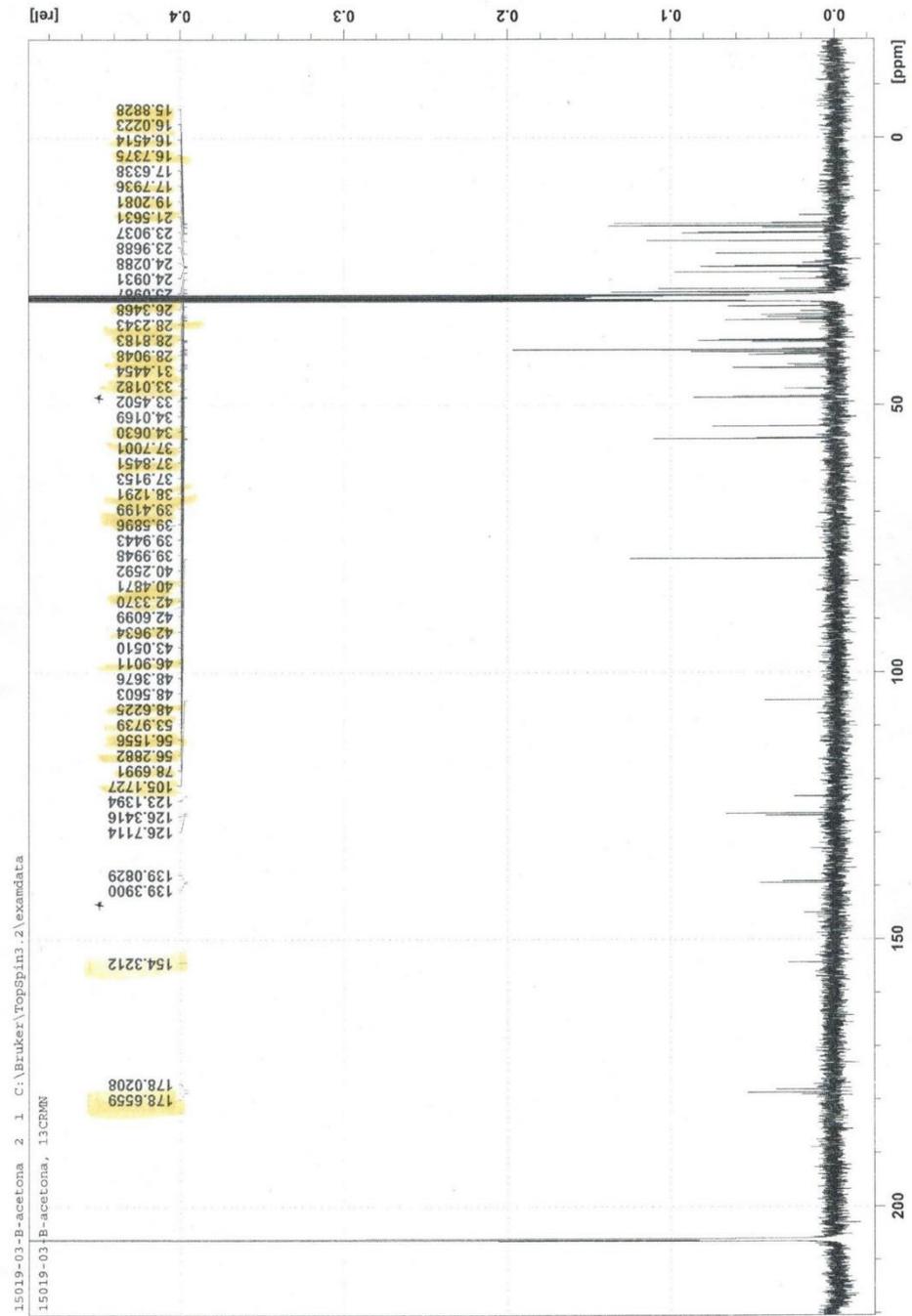
17. Hong Xia L, Ming Yu D, Jian Yuan Y. Separation and identification of the phthalic anhydride derivatives of liquisticum Chuanxiong hort by GC-MS, TLC, HPLC-DAD, and HPLC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 2002 Mar;40(3):156-61.
18. Reyes López M, Villa Treviño S, Arriaga Alba M, Alemán Lazarini L, Rodríguez Mendiola M, Arias Castro C, Fattel Fazenda S, de la Garza M. The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicol In Vitro journal* 2005 Feb;19(1):91-7.
19. Rojas AM. Tratado de Medicina Tradicional Mexicana: Cola de Caballo. 2001 [Online] Disponible en: <http://www.tlahui.com/medic/medic11/equisetum.htm> Revisado el 03 mayo 2010]
20. Taboas Guimerans S. Curso Fitoterapia. 2005 [Online] Disponible en: <http://www.mailxmail.com/curso-fitoterapia> Consultado Marzo 2015.
21. Ramírez Moreno LA, García Barrios LE, Rodríguez HC, Morales HE, Castro RA. Evaluación del efecto insecticida de extractos de plantas sobre *Leptophobia aripa* Elodia. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 2001; (60) 50 – 56.
22. Galicia AH, Mendoza de GP, Salinas SD, López Arellano ME, Liébano HE, López AU, Valladares Cisneros G. In Vitro Nematocidal Activity of Plant Extracts of Mexican Flora against *Haemonchus contortus* Fourth Larval Stage. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci* 2008 Dec;1149:158-60.
23. Bonifaz A. Capítulo 7: Dermatofitosis. *Micología Médica básica*. 4a ed. México, DF: Mc-Graw Hill Editorial; 2012. p 93-131.
24. Pereira R, Fachinetto R, de Souza Prestes A, Puntel R, Santos da Silva G, Heinzmann B, Boschetti T, Athayde M, Bürger M, Morel A, Morsch V. Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research* 2009 May;34(5):973-83.
25. Liu T, Liu FG, Xie HQ, Mu Q. Phytopathogenic fungal inhibitors from celery seeds. *Nat Prod Commun.* 2012 Jul;7(7):889-90.
26. Arslan U, İlhan K, Karabulut OA. Antifungal activity of aqueous extracts of spices against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Allelopathy Journal* 2009; Ene 24(1):207-213.
27. Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Maxia A, Frau MA, Gonçalves MJ, Salgueiro L. Isolation of the volatile fraction from *Apium graveolens* L. (Apiaceae) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: chemical composition and antifungal activity. *Nat Prod Res* 2013;27(17):1521-7.
28. John JB and Shen-Chieh C. The Structural Diversity of Phthalides from the Apiaceae. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 891-900
29. Krishnakumar V, Kumar M, Jayamani N. Molecular structure, NMR, UV-Visible, vibrational spectroscopic and HOMO, LUMO analysis of phthalide using DFT calculations. *Int.J.Curr.Res.Aca.Rev.*2015; 3(7):31-45
30. Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorri RT. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 2002 Dic; 40(12):1701-8.
31. Arteaga S, Andrade Cetto A, Cárdenas R. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol* 2005 Abr 26;98(3):231-9.

ANEXOS

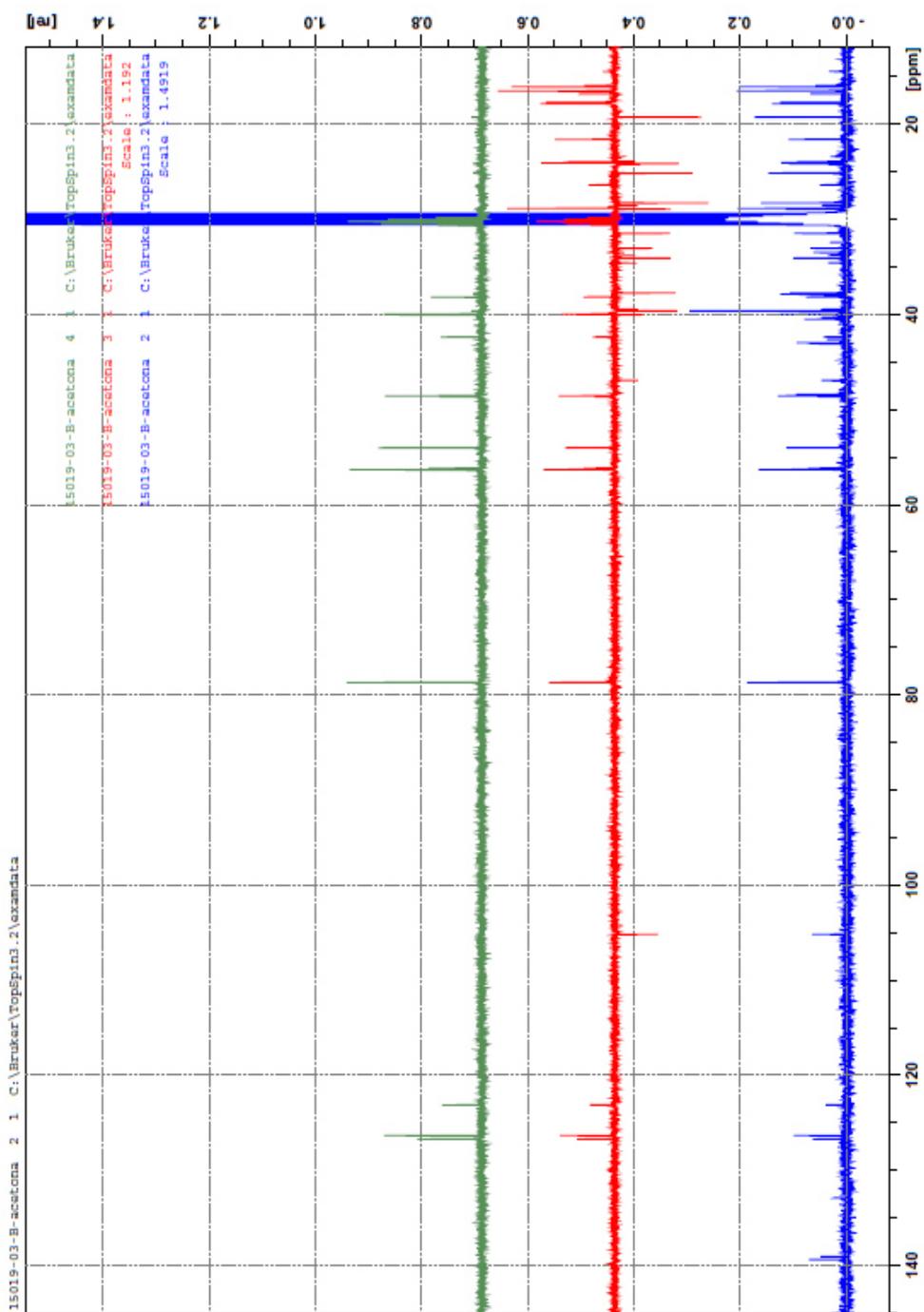
ANEXO 1. Espectrograma de infrarrojo del compuesto 2 del extracto metanólico de Romero.



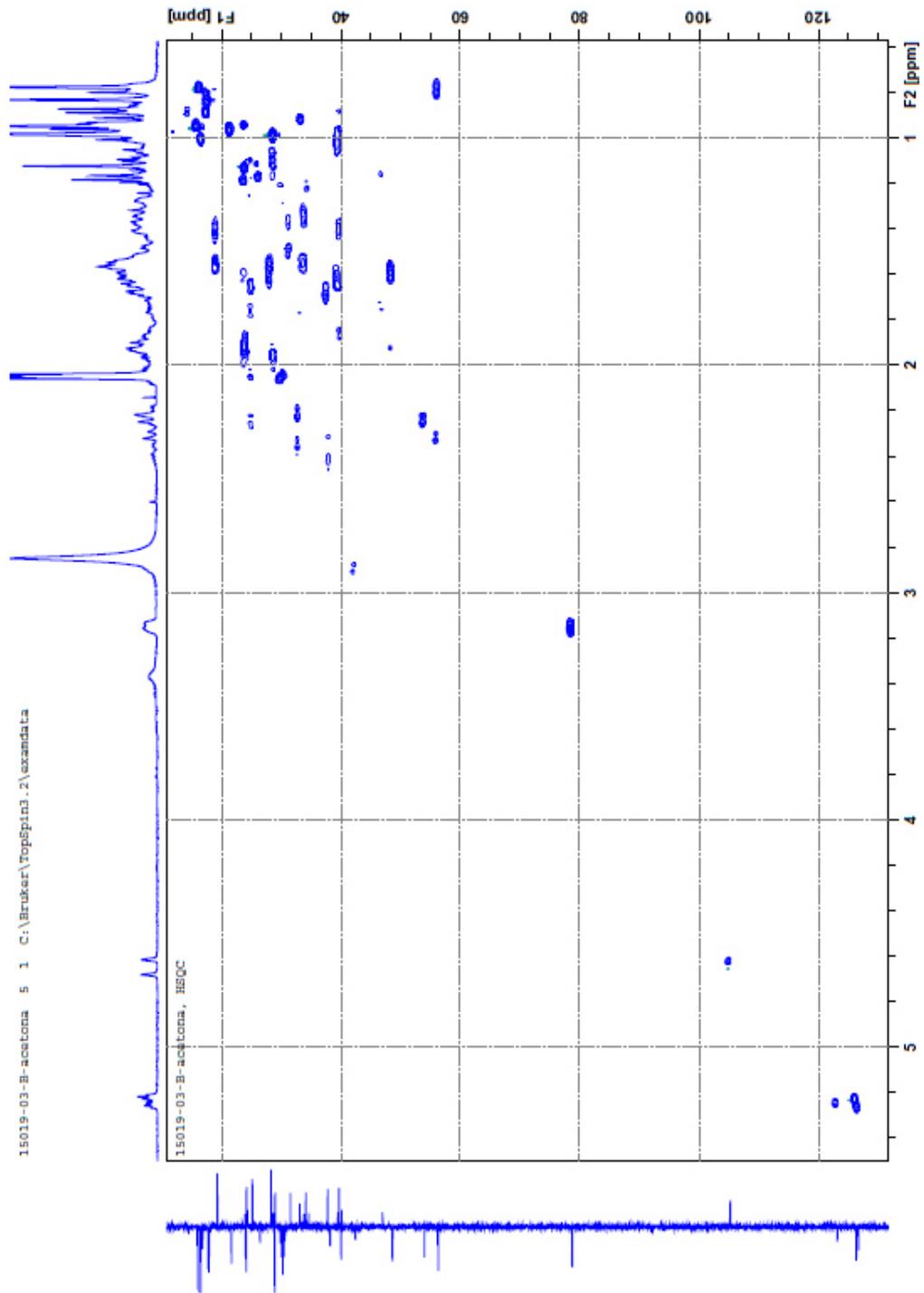
ANEXO 3. Espectrograma de ^{13}C -RMN del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.



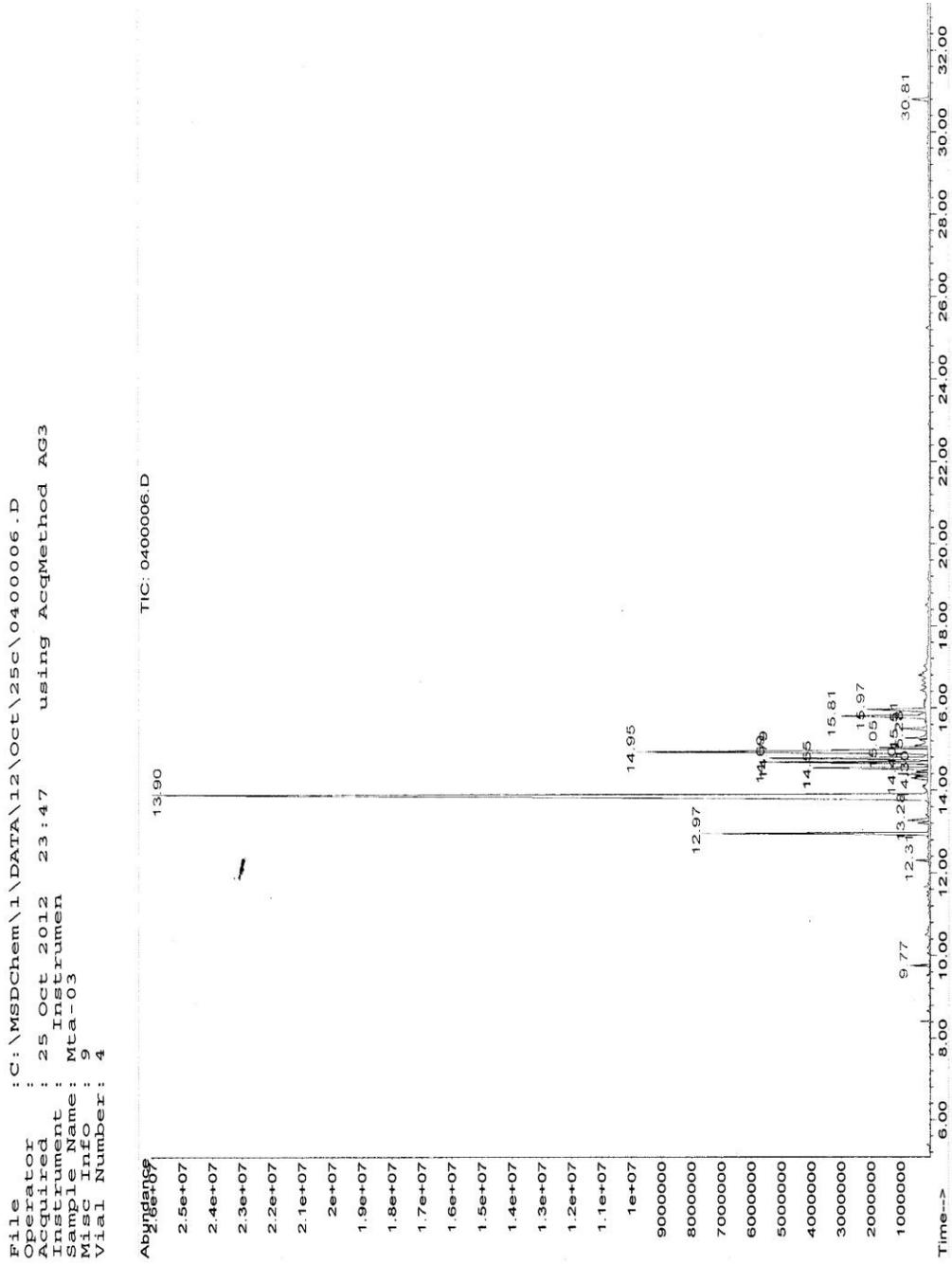
ANEXO 4. Análisis DEPT del compuesto 2 del extracto metanólico de Romero.



ANEXO 5. Espectrograma de HSQC del compuesto 2 del extracto metanólico de romero.

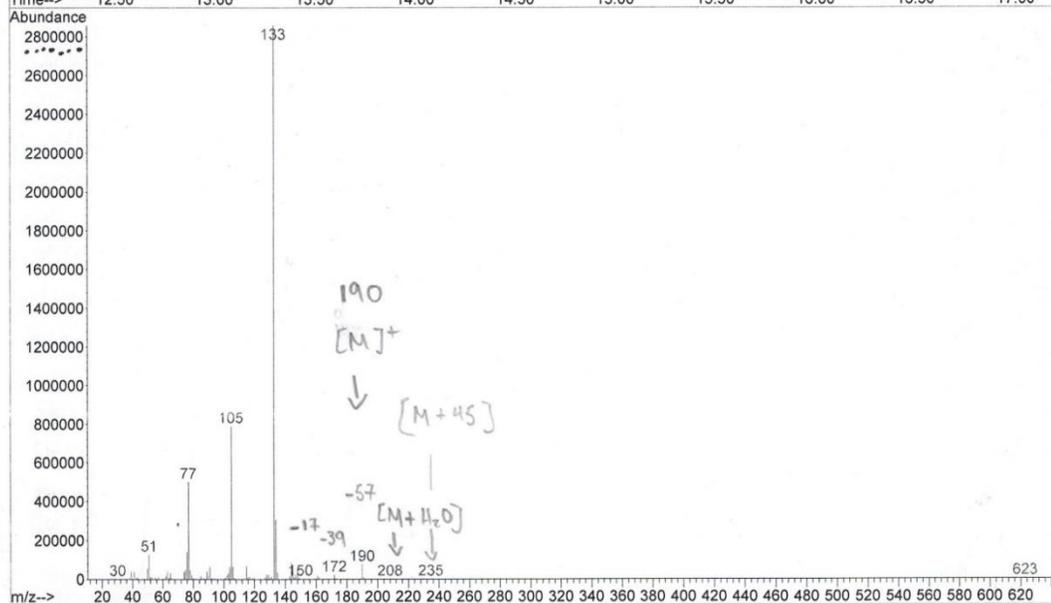
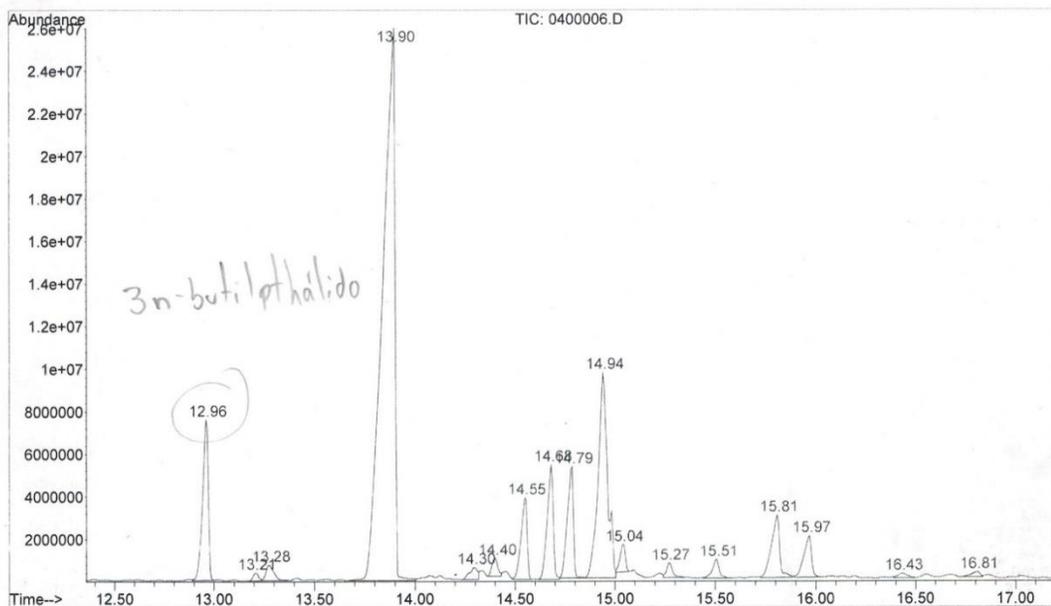


ANEXO 6. Cromatograma de gases de la fracción 52 de semilla de apio.



ANEXO 7. Patrón de fragmentación del compuesto con tiempo de retención 12.97.

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\25c\0400006.D
 Operator :
 Acquired : 25 Oct 2012 23:47 using AcqMethod AG3
 Instrument : Instrumen
 Sample Name: Mta-03
 Misc Info : 9
 Vial Number: 4



ANEXO 8. Patrón de fragmentación del compuesto con tiempo de retención 13.90

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Oct\25c\0400006.D
Operator :
Acquired : 25 Oct 2012 23:47 using AcqMethod AG3
Instrument : Instrumen
Sample Name: Mta-03
Misc Info : 9
Vial Number: 4

neocnidilide

