

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Pleurochaete luteola* (B.), *Manfreda virginica* (L.) y *Bernardia myricifolia* (S.) sobre patógenos de importancia médica.

POR

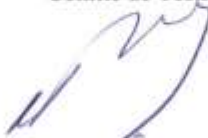
BIÓLOGO ERICK MAURICIO VELÁZQUEZ CASTILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos

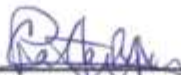
2025

Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Pleurochaete luteola* (B.),
Manfreda virginica (L.) y *Bernardia myricifolia* (S.) sobre patógenos de importancia
médica

Comité de Tesis

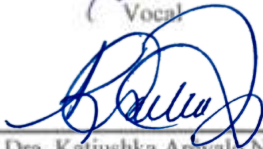

Dra. Catalina Rivas Morales
Presidente


Dra. Ethel Daniela Cabello Ruiz
Secretario


Dra. Catalina Leos Rivas
Vocal


Dr. Jorge Luis Hernández Pinero
Vocal


Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Vocal


Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirectora de Posgrado



Hoja de Firmas

Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Pleurochaete luteola* (b.),
Manfreda virginica (l.) y *Bernardia myricifolia* (s.) sobre patógenos de importancia
médica

Dirección de Tesis



Dra. Catalina Rivas Morales

Director

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Biológicas por la implementación del posgrado de Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos, al Laboratorio de Química Analítica por el apoyo de los recursos y la orientación en la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado en la Convocatoria Becas nacionales para estudios de posgrado 2023-2, con el código 650e14230f7c6c312e625e52

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis Dra. Catalina Rivas Morales, la Dra. Catalina Leos Rivas, Dra. Ethel Daniela Cabello Ruiz y el Dr. José Ezequiel Viveros Valdez por la asesoría general sobre la dirección de mi maestría, tesis y su invitación a participar en diferentes eventos académicos.

Dra. Edelia Claudina Villareal Ibarra y el Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez por su ayuda introductoria con las técnicas de antioxidantes y utilización de equipos

Al Dr. Jorge Luis Hernández Piñero por su tiempo de asesorías en innovadoras técnicas y aspectos dentro de la botánica que me ayudaron a desarrollarme a lo largo de mi preparación como maestro.

Al Dr. David Gilberto García Hernández por las incontables dudas que me resolvió sobre procedimientos, utilización de equipos y teorías locas sobre mis metodologías.

DEDICATORIA

A mis padres por siempre estar para mí, apoyándome en mis decisiones durante toda mi carrera. A mi madre Diana Jaqueline Castillo Robles y padre Carlos Guillermo Velázquez Pereda A mis hermanos Carlos Eugenio, Adrián Antonio y Sergio Alejandro

A mis abuelos los cuales estuvieron para cuidarme Nicolasa Pereda, Ma. Guadalupe Robles Robles, María Refugio Robles Robles, Margarita Robles Robles, Ricardo Villarreal Sánchez, Irma Pereda y Sergio Salas Cano

A mis primos Gustavo Martínez Ortuño, Brenda Martínez Ortuño y Valeria Salas.

A mis amigos de la infancia Hugo Salas Esquivel y Jesús Manuel Rodríguez Cisneros

A mi familia que se encuentra en Nuevo León, Tamaulipas, Guanajuato y Guadalajara.

A mi amigo M.C. Raúl Ernesto Narváez Elizondo quien me apoyó en estudios etnobotánicos, así como animarme a ir a mi primer congreso internacional presencial

A mis Doctores de Licenciatura al Dr. Sergio Salcedo Martínez por su asesoría sobre la ecología de los musgos y posibles teorías biológicas y al Dr. Juan Antonio García Salas por brindarme apoyo a lo largo de mi maestría y abriéndome las puertas a diferentes proyectos y apoyándome con los propios

A mis amigos de laboratorio Alejandro, Max, Sara, Alondra, Jair, Santiago, Marcela, Daniel, Israel y sobre todo a Fernanda Herrera, Corina Romero, Princesa Arvizu y Sebastián González por su incansable apoyo con asesoría y apoyo con mis experimentos a lo largo de la maestría.

A mis amigos biólogos que siempre están para apoyarme sin importar la situación: Cinthia Sarahí Ortega Mata, Jorge Luis Martínez Ávila, Luis Francisco Ibarra Sánchez, Oscar Eduardo Covarrubias Treviño, Kathia Lizeth Guevara Monsiváis, Miguel Eduardo Carrizales Garza, Ing. Aarón Altamirano Salcido, Ing. Antonio Vázquez y el Ing, Carlos Miguel Martínez Ávila.

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT.....	2
3	INTRODUCCIÓN	3
4	ANTECEDENTES	5
4.1	Plantas en estudio.....	5
4.1.1	Los musgos	5
4.1.2	Los amoles	7
4.1.3	La familia Euphorbiaceae	9
4.1.4	Importancia microbiológica	10
4.1.5	Resistencia microbiana.....	11
4.2	Cepas farmacorresistentes.....	11
4.3	Bacterias gram negativas.....	11
4.3.1	<i>Escherichia coli</i>	11
	<i>Escherichia coli</i> 25922	11
4.4	Bacterias gram positivas	12
4.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
	<i>Staphylococcus aureus</i> BAA44.....	13
4.4.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	13
	<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	13
4.5	Antioxidantes	14
4.5.1	Prueba ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).....	14
4.5.2	Prueba del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo),.....	14
4.6	Toxicidad.....	15
5	JUSTIFICACIÓN	16
6	HIPÓTESIS	17
7	OBJETIVOS	18
7.1	General	18
7.2	Objetivos específicos	18
8	MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
8.1	Equipo	19
8.2	Material biológico	19

8.2.1	Bacterias	19
8.2.2	Vegetales	19
8.3	Recolección del material biológico	19
8.4	Obtención de los extractos	22
8.5	Evaluación actividad antimicrobiana	23
8.5.1	Activación de las cepas bacterianas	23
8.5.2	Método de difusión en disco	23
8.5.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	24
8.5.4	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	26
8.6	Caracterización fitoquímica de los extractos	27
8.6.1	Alcaloides.....	27
8.6.2	Carbohidratos	27
8.6.3	Cumarinas	27
8.6.4	Esteroles y triterpenos	27
8.6.5	Flavonoides	27
8.6.6	Saponinas	28
8.6.7	Quinonas	28
8.6.8	Sesquiterpenlactonas:	28
8.7	Actividad antioxidante	29
8.7.1	Ensayo con ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)): 29	
8.7.2	Ensayo con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	29
8.8	Toxicidad.....	30
8.8.1	Ensayo de hemólisis	30
	Interpretación de potencial hemolítico:	32
8.9	Análisis de datos	33
9	RESULTADOS	34
9.1	Rendimiento de extracción.....	34
9.2	Caracterización fitoquímica	34
9.3	Prueba de difusión en disco.....	35
9.4	Toxicidad por hemólisis.....	36
9.5	Cantidad mínima inhibitoria (CMI) y cantidad mínima bactericida (CMB) ...	36
9.6	Prueba de actividad antioxidante	36

10	DISCUSIÓN	38
11	CONCLUSIONES	41
12	PERSPECTIVAS.....	42
13	BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No	Título	Página No
1	Esquema de la reacción de ABTS con Trolox. Imagen tomada de Moraes-de-Souza <i>et al.</i> (2021). © 2021 por los autores. Licenciado bajo CC BY 4.0.	14
2	Esquema de la reacción de DPPH con compuestos antioxidantes. Imagen adaptada de Moraes-de-Souza <i>et al.</i> (2021). © 2021 por los autores. Licenciado bajo CC BY 4.0.	14
3	Ejemplares de <i>Pleurochaete luteola</i> hidratados	20
4	Filidio de <i>Pleurochaete luteola</i> hidratado	20
5	Flor de <i>Manfreda virginica</i>	21
6	Ejemplar de <i>Manfreda virginica</i>	21
7	Hoja y fruto de <i>Bernardia myricifolia</i>	21
8	Inflorescencia de <i>Bernardia myricifolia</i>	21
9	Procedimiento para la obtención de extractos y determinación del rendimiento	22
10	Procedimiento para la reactivación de las cepas bacterianas	23
11	Preparación del inóculo para las pruebas de actividad antimicrobiana	24
12	Prueba de difusión en disco	24
13	Representación de placa de 96 pozos y sus divisiones para las pruebas de concentración mínima inhibitoria	25
14	Metodología de la prueba de concentración mínima inhibitoria	25
15	Metodología de la prueba de concentración mínima bactericida	26
16	Procedimiento general de la caracterización fitoquímica de los extractos	28
17	Preparación del paquete globular para la prueba de hemólisis	32
18	Prueba de hemólisis. H: pocillos de prueba de hemólisis, C+: control positivo, B: blanco	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No	Título	Página No
1	Taxonomía de <i>Pleurochaete luteola</i> (besch.) Thér.	7
2	Taxonomía de <i>Manfreda virginica</i> (l.)	8
3	Taxonomía de <i>Bernardia myricifolia</i> (s.)	9
4	Taxonomía de <i>Escherichia coli</i> (e.)	11
5	Taxonomía de <i>Staphylococcus aureus</i> (r.)	12
6	Taxonomía de <i>Enterococcus faecalis</i>	13
7	Coordenadas de los puntos de colecta de las plantas de estudio	20
8	Código de muestra de las plantas resguardadas en el herbario de la facultad de ciencias biológicas, UANL	20
9	Concentración de las soluciones para pruebas de hemólisis	30
10	Concentración de las soluciones del control blanco de la prueba de hemólisis	30
11	Tabla de interpretación de potencial hemolítico	31
12	Tipo de respuestas registradas en las pruebas y modelo estadístico utilizado	33
13	Rendimientos de extracción por soxhlet de las plantas de estudio	34
14	Caracterización fitoquímica de los extractos hexánicos y metanólicos de <i>B. myricifolia</i> , <i>M. virginica</i> y <i>P. luteola</i>	34
15	Inhibición (mm) de los extractos metanólicos y hexánicos de las plantas de estudio contra <i>S. aureus</i> BAA44 y <i>E. faecalis</i> 29212.	35
16	Inhibición de los extractos metanólicos de las plantas de estudio	35
17	Resultados de las pruebas de toxicidad por hemólisis de los extractos metanólicos de las plantas de estudio (dunnet, $p < 0.05$)	35
18	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos metanólicos de las plantas de estudio contra <i>S. aureus</i> BAA-44 y <i>E. faecalis</i> 29212	36
19	Actividad antioxidante IC ₅₀ de los extractos metanólicos en DPPH y ABTS	36
20	Actividad antioxidante IC ₅₀ de las curvas de calibración en DPPH y ABTS	36
21	Actividad Equivalente de Ácido Gálico (EAG) y la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) de los extractos metanólicos.	37

GLOSARIO DE TERMINOLOGÍAS

Termino	Significado
μL	Microlitro
ABTS	Ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ANP	Área natural protegida
ATCC	American Type Culture Collection
Balc C	Cepa albina de laboratorio del ratón común
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Bactericida
DPPH	(2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC50	Concentración inhibitoria media
LT	Toxinas termolábiles heat-labile enterotoxin
MHA	Mueller-Hinton agar
MNCS	Monumento Natural Cerro de la Silla
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
OMS	Organización Mundial de la Salud
P.G.	Paquete Globular
PBS	Buffer fosfato salino
ROS	Reactive Oxygen Species
TROLOX	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	UV: Ultravioleta

RESUMEN

Actualmente, las bacterias presentan una creciente resistencia a múltiples fármacos convencionales utilizados para controlar las enfermedades que provocan. Por ello, se ha optado por la búsqueda de nuevos métodos para combatirlas, especialmente a partir de metabolitos secundarios de plantas empleadas tradicionalmente. En este estudio se evaluó la actividad bactericida, hemolítica y antioxidante de *Bernardia myricifolia*, *Pleurochaete luteola* y *Manfreda virginica*. Se realizó una extracción secuencial con hexano y posteriormente, con metanol. La actividad antibacteriana se determinó mediante difusión en pozo, concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) por microplaca. Los extractos metanólicos de *P. luteola* y *B. myricifolia* mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* BAA-44, con CMI de 2.5 mg/mL y CMB de 5 mg/mL. Además, el extracto metanólico de *P. luteola* presentó actividad contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, con los mismos valores de CMI y CMB. La evaluación hemolítica resultó negativa en todos los extractos analizados. Por otra parte, los extractos metanólicos mostraron actividad antioxidante con valores de Concentración Inhibitoria media (IC₅₀) entre 1.8 y 4.3 mg/mL en la prueba de DPPH, y entre 1.9 y 18.9 mg/mL en la prueba de ABTS. Estos resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (EAG), con un rango de 0.73 a 2.47 mg EAG por 100 g de planta seca, y en equivalentes de Trolox (TEAC), con valores entre 0.07 y 0.72 mg TEAC por 100 g de muestra. Los extractos metanólicos de *P. luteola* y *B. myricifolia* presentan una alternativa para el desarrollo de fármacos; por otro lado, *M. virginica* presenta una opción para aplicarse como antioxidante coadyuvante en fármacos y/o suplementos alimenticios.

ABSTRACT

Currently, bacteria exhibit increasing resistance to multiple conventional drugs used to control the diseases they cause. Therefore, the search for new methods to combat them has become a priority, particularly through secondary metabolites derived from traditionally used plants. In this study, the bactericidal, hemolytic, and antioxidant activities of *Bernardia myricifolia*, *Pleurochaete luteola*, and *Manfreda virginica* were evaluated. A sequential extraction was carried out using hexane, followed by methanol. Antibacterial activity was determined through well diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) using microplate assays. The methanolic extracts of *P. luteola* and *B. myricifolia* showed activity against *Staphylococcus aureus* BAA-44, with MIC values of 2.5 mg/mL and MBC values of 5 mg/mL. Additionally, the methanolic extract of *P. luteola* showed activity against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, with the same MIC and MBC values. All extracts tested negative in the hemolytic assay. On the other hand, the methanolic extracts demonstrated antioxidant activity with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values ranging from 1.8 to 4.3 mg/mL in the DPPH assay, and from 1.9 to 18.9 mg/mL in the ABTS assay. These results were expressed in gallic acid equivalents (GAE), ranging from 0.73 to 2.47 mg GAE per 100 g of dry plant, and in Trolox equivalents (TEAC), with values between 0.07 and 0.72 mg TEAC per 100 g of sample. The methanolic extracts of *P. luteola* and *B. myricifolia* represent a potential alternative for drug development, while *M. virginica* offers a promising option for use as an antioxidant adjuvant in pharmaceuticals and/or dietary supplements.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos ancestrales, las plantas medicinales han sido utilizadas en diversos tratamientos grabado en el conocimiento de la mayoría de las culturas en donde se ha encontrado registros de su empleo en ritos curativos, administración de diversas plantas en infusiones, tinturas etc. Hoy se conoce como la medicina tradicional, (CONABIO, 2020; Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2021). México cuenta con una vasta fitodiversidad de plantas medicinales en donde se conocen alrededor de 4,500 especies, que se han utilizado para el tratamiento de distintos malestares. Existen reportes en los cuales afirman que el 90% de la población mexicana ha recurrido alguna vez a la herbolaria medicinal desde malestares generales hasta casos más específicos, como el tratamiento de enfermedades causados por infecciones bacterianas (SEMARNAT 2021). En la actualidad la resistencia antimicrobiana es uno de los mayores problemas de salud pública, esto debido a la prevalencia de las bacterias patógenas ante diferentes tratamientos, además del desarrollo de defensas efectivas que contrarrestan a los antibióticos convencionales, aumentando así su resistencia lo que se refleja en tratamientos menos efectivos, mayores costos de cuidado médico y mayores tasas de mortalidad (Velazquez-Meza 2024). Entre estos microorganismos encontramos a *Escherichia coli*, comúnmente conocida por generar diarrea entérica siendo unas de las bacterias infecciosas más comunes a nivel mundial, con una frecuencia clínica de aproximadamente 630 millones y entre 5 a 6 millones de decesos anuales a nivel mundial (Molina-López y Eslava-Campos 2015); *Staphylococcus aureus* con una tasa de mortalidad del 18-29% y una prevalencia del 13 al 38 % (Feng-Yee 2003), y *Enterococcus faecalis* con una prevalencia que oscila de 24% a 77% (Charles 2006). además que desarrolla resistencia después del tratamiento que varía entre el 0.6% y el 97% según el fármaco (Jabbari-Shiadeh *et al.* 2019). Así mismo por la adaptabilidad, capacidad epidemiológica y prevalencia, las organizaciones mundiales enfocadas al sector salud las han catalogado según su nivel de amenaza, de tal manera se han publicado listas prioridad de estudio en el cual se busquen de nuevos tratamientos farmacológicos que las contrarresten. En los últimos años en las plantas medicinales se ha visto su potencial como fuente natural de antioxidantes para prevenir los daños realizados por los radicales libres que comúnmente son llamados especies reactivas del oxígeno (ERO) o Reactive Oxygen

Species (ROS) (Núñez 2011), éstas son sustancias químicas que presentan en su estructura uno o más electrones no apareados, haciéndolas altamente reactivas y fácil de reaccionar con moléculas cercanas, dañando macromoléculas como el ADN y conjuntos de proteínas participando así, en enfermedades degenerativas como el cáncer (Zamora 2007 y Rivas-Morales *et al.* 2016). Estas moléculas suelen generarse durante el metabolismo natural, aunque también pueden ser producidos por contaminantes ambientales (atmósfera, agua, suelo), radiaciones ionizantes (UV, gamma), consumo de drogas, dietas desbalanceadas, fertilizantes, pesticidas, estrés físico o psíquico (Coronado 2015). A pesar de que estos remedios, como las infusiones de té, son ampliamente utilizados tanto por la población en general, como médicos (Taddei-Bringas *et al.* 1999), son los escasos estudios que confirmen sus propiedades curativas y describan la dosis segura de aplicación, un uso desmedido del recurso puede ocasionar toxicidad (Moreno-Pérez *et al.* 2020).

ANTECEDENTES

Las plantas han sido utilizadas a lo largo de la historia para satisfacer diversas necesidades del ser humano, desde las más básicas, como el alimento y la construcción de herramientas y viviendas, hasta otras más complejas, como la elaboración de textiles, tintes, el cumplimiento de tradiciones religiosas y el tratamiento de enfermedades. Esto refleja la estrecha relación que ha existido entre las plantas y las personas desde tiempos antiguos (Sahagun 1938).

Plantas en estudio

1.1.1 Los musgos

Los musgos son pequeñas plantas que suelen habitar en zonas húmedas y secas, en oscuridad o parcialmente expuestas que suelen crecer al margen del suelo; en México se conocen 984 especies de musgos, 325 géneros y 75 familias (Delgadillo-Moya 2014). Los musgos se han empleado en la manufactura de lechos, almohadas, gorros, y en la decoración de los nacimientos tradicionales de Navidad. Existen registros de usos medicinales en el tratamiento de afecciones cardíacas en la época de la colonia y actualmente se ha demostrado a través de estudios fitoquímicos que estas plantas presentan compuestos químicos prometedores en medicina como antitumorales, anticancerígenos, antifúngicos y antialérgicos (Delgadillo-Moya 2021). Veljić *et al.* 2008 publicaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de los musgos colectados en Serbia entre los años 1998 y el 2005 los cuales fueron: *Pleurozium schreberi*, *Palustriella commutata*, *Homalothecium philippeanum*, *Anomodon attenuatus*, *Rhytidium rugosum*, *Hylocomium splendens*, *Dicranum scoparium* y *Leucobryum glaucum*, encontrando actividad contra las bacterias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Micrococcus flavus* (ATCC 9341), *Bacillus subtilis* (ATCC 10707), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (aislado clínico), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), encontrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) entre 2.5 y los 25 mg/mL

Se realizó un estudio sobre la etnobotánica de las comunidades de San Pablo Macuiltianguis y San Juan Luvina dentro del municipio de San Pablo, Macuiltianguis, Oaxaca, México, aplicando encuestas a 179 locatarios desde juveniles, adultos y adultos mayores, encontrado un total de 237 especies útiles, dentro del cual se menciona a *Pleurochaete squarrosa*, como una planta medicinal utilizada para limpiar/desinfectar heridas y como té de infusión para el dolor estomacal (Lopez-Santiago, 2015). En Italia, Basile y colaboradores en 1998 publicaron un estudio donde se observó la actividad antibacteriana y toxicidad del extracto cetónico de *P. squarrosa*, dentro del cual se separó el extracto mediante centrifugación y buffer fisiológico de Tris, el extracto obtenido mediante el buffer presentó actividad contra *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 10875), *S. aureus* (ATCC 13709), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Enterobacter cloacae* (ATCC 10699), *Bacillus subtilis* (ATCC 10774), *Proteus mirabilis* (ATCC 12454) y *Citrobacter diversus* (ATCC 25408); además para la prueba de toxicidad se realizaron soluciones con el sobrenadante recuperado siendo aplicado en ratones Balb C. Durante el monitoreo no se observaron síntomas de dolor ni cambios de hábitos de vida de los ejemplares, con lo que concluyeron que los extractos cetónicos de *P. squarrosa* presenta actividad efectiva contra bacterias Gram negativas y no presenta toxicidad notable. Por otro lado, Gonca y colaboradores en 2014 publicaron un estudio sobre la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *P. squarrosa*, colectado en Maçka, Turquía. La extracción se efectuó por hidrodestilación para posteriormente ser disueltos en hexano grado HPLC posteriormente realizaron una cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-FID/MS), encontrando que estaba principalmente conformado de aldehídos, monoterpenos e hidrocarburos, con los compuestos Nonanal (C₉H₁₈O) y Heptanal (C₇H₁₄O) como los más abundantes, aunado a lo anterior obtuvieron respuesta antimicrobiana contra, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC607), *Candida albicans* (ATCC 60193) y *Saccharomyces cerevisiae* (RSKK 251), concluyendo que el extracto de *P. squarrosa* presenta una moderada actividad antimicrobiana. Por último, Jiménez y colaboradores en 2011 reportaron cualitativamente la actividad antioxidante en los extractos acuosos y etanólicos del musgo *P. luteola* por medio de pruebas con ABTS, además de esto se determinó de la presencia de polifenoles.

1.1.1.1 *Pleurochaete luteola* (B.)

Bryophyta perteneciente a la familia Pottiaceae, de un color verde claro o de tonos amarillentos, mide hasta 4 cm de alto, tienen hábito de cojín, los filidios miden entre 3-5 mm de largo, con células basales marginales hialinas alargadas con una seta de 13 mm. Se encuentra sobre suelo arcilloso o arenoso expuesto, roca calcárea, en zonas de exposición moderada a totalmente expuestas, en ciertos casos se puede presentar sobre otras plantas. Se distribuye desde el Sur de Estados Unidos, México, Guatemala, Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú, Bolivia, Argentina y Haití. En México se encuentra en los estados de Chiapas, Coahuila, Guerrero, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí.

Tabla 1 Taxonomía de *Pleurochaete luteola* (Besch.) Thér.

Reino: Plantae

División: Bryophyta

Clase: Bryopsida

Orden: Pottiales

Familia: Pottiaceae

Género: *Pleurochaete*

Especie: *Pleurochaete luteola* (B.)

1.1.2 Los amoles

Los amoles son plantas agrupadas por un término tradicional originario del náhuatl y se les atribuye a las plantas utilizadas por sus propiedades saporíferas, englobando desde agaves y parientes, hasta arbustos y árboles (Montemayor *et al.*, 2008). Dentro del grupo, se encuentra el género *Manfreda* conformado de 50 especies dentro de las cuales se ha reportado, su uso tradicional con potencial medicinal. Sus usos datan de hace siglos (Verhoek 1978) siendo el registro más antiguo, el estudio de La llave (1885) donde reporta a las manfredas popularmente en el norte de México como “Manfreda” y en el sur como “Huaco” utilizadas contra los efectos de las mordeduras de serpientes de cascabel, donde masticaban y/o bebían los jugos de los rizoides de, *M. maculosa*. Hartman (1892) reporta

el uso de las manfredas como barcaso para la pesca esto en Guajochic, Chihuahua. Palmer (1898) reporta otro “huaco” en Saltillo, México donde se utilizaban las hojas mallugadas *M. brunnea* sumergiéndolas en la bebida alcohólica conocida como “agua ardiente” para posteriormente, el extracto ser aplicado de forma tópica y/o ingerido; también otro uso de la especie es que el extracto se liofiliza y se utiliza como yeso sobre heridas para su curación. Rose (1899) reporta el uso de *M. scabra* para obtener jabón, shampoo y fibras para ropa por la etnia de los Huicholes al Sur de la Sierra Madre Occidental además de los Rarámuri. También se tienen registros en Estados Unidos de América donde Gattinger (1894) menciona el uso del rizoide de *M. virginica* como remedio contra los cólicos y la dispepsia, en el sur de Tennessee, Estados Unidos de America; después Taylor (1940) nos menciona sus usos por la tribu de los Catawba, en Carolina del Sur; donde se colocaba el rizoma mallugado con una cucharada de whiskey como remedio para la hidropesía. Además de sus usos como remedio para el malestar de estómago, carminativo y actividad antiespasmódica. Marker *et al.* (1943) reporta la presencia de gitogenina el cual es un triterpeno en las raíces de *M. virginica*. Por último, Jacobs y Burlage (1958) reporta su propiedad como tónico amargo en Carolina del Norte. En tiempos actuales se han reportado estudios de las especies *M. maculata* y *M. brachystachys* como barbasco para la pesca, dado a su potencial de liberar metabolitos que aturden a la ictiofauna (Orellana, 2012). También se han reportado por Vargas-Vizuet y colaboradores (2022) el uso de *M. variegata* triturado como tópico contra el malestar de espalda y pulmonía en el municipio de Teziutlán, Puebla, México.

1.1.2.1 *Manfreda virginica* (L.)

Es una planta herbácea, perenne de 8 a 40 cm de altura, hojas de 15-45 cm de largo lanceoladas, onduladas, semisuculentas, de un color verde claro con tonos rojizos a purpuras, inflorescencia de 90-150 cm de alto, de un color verde, porción fértil de 15-68 cm de alto, flores de 1.8-3.1 cm de largo de coloración amarilla con tonos rojos o pardos, semillas de 0.3-0.4 cm de largo y 0.3 cm de ancho, plano-cóncava de un color negro opaco; se encuentra a elevaciones entre 0-600 msnm, ampliamente distribuida en el oeste de los Estados Unidos de América, en México, solo se reporta en los estados de Coahuila,

México, Nuevo León y Tamaulipas (CONABIO 2019a; Red de Herbarios del Noreste de México 2022a).

Tabla 2 Taxonomía de *Manfreda virginica* (L.)

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Asparagaceae

Género: *Manfreda*

Especie: *Manfreda virginica* (L.)

1.1.3 Familia Euphorbiaceae

Esta familia posee 300 géneros y alrededor de 8,000 especies distribuidas en todo el mundo, son representadas por herbáceas, árboles y arbustos. Dentro del grupo se han reportado géneros con varias propiedades medicinales como lo son *Acalypha indica*, *Acalypha*, *Euphorbia*, *Croton*, *Jatropha*, *Ricinus*, destacando la aplicación de estas plantas para el tratamiento de malestares de piel, sensoriales, respiratorios, embarazo, envenenamiento, dolor general, nutrición, sistema nervioso, enfermedades musculares, esqueléticas, enfermedades mentales, cirugías, infecciones, inflamaciones, tratamiento del sistema endocrino, tratamiento en el sistema digestivo y malestares del sistema sanguíneo (Ernst *et al.* 2015; Islam *et al.* 2019). Dentro del género *Bernardia* se ha reportado a *B. mexicana* con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y reumatismo (Wamucii 2023b). Así mismo *B. myricifolia* se ha utilizado como tratamiento para enfermedades de piel, fiebre y como antiespasmódico (Wamucii 2023a).

1.1.3.1 *Bernardia myricifolia* (S.)

Es un arbusto que mide 1.4-2 m de altura, de foliaje perenne con hojas relativamente pequeñas de un tamaño entre 1.5 a 3 cm con una forma ovalada y de

contorno serrulado, presenta inflorescencias de 15 mm durante los periodos de primavera-verano, se suele encontrar a una elevación entre 100-1300 msnm. Esta especie esta reportada para los estados de Baja California Sur, Coahuila de Zaragoza, Chihuahua, Durango, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (CONABIO 2019b; Red de Herbarios del Noreste de México 2022b)

Tabla 3 Taxonomía de *Bernardia myricifolia* (S.)

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Bernardia*

Especie: *Bernardia myricifolia* (S.)

1.1.4 Importancia microbiológica

Durante la investigación que se realiza con microorganismos patógenos, se debe tomar medidas de precaución para evitar brotes de contaminación que puedan llegar a representar un peligro a la salud tanto del investigador como de terceros, ya que Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado el nivel de riesgo potencial que representa manejar estos organismos:

Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo). Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en humanos o animales.

Grupo de riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo), son los agentes patógenos que pueden provocar enfermedades en humanos o animales pero que tienen pocas probabilidades de causar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo 3 (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo), se presentan los agentes patógenos que suelen provocar enfermedades en humanos o animales graves, de manera ordinaria no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Grupo de riesgo 4 (riesgo individual y poblacional elevado) que son los agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en humanos o animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces (Organización Mundial de la Salud 2005).

1.1.5 Resistencia microbiana

Debido al uso indiscriminado de fármacos los microorganismos han desarrollado resistencia los medicamentos convencionales, ya que han generado mecanismos que le permiten sobrevivir a las acciones de los medicamentos diseñados para tratar las diversas enfermedades ocasionadas por el o los microorganismos en cuestión.

Cepas farmacorresistentes

Bacterias Gram negativas

1.1.6 *Escherichia coli*

Es una de las causantes más comunes de enfermedad diarreica o gastroenteritis, siendo el público infante y geriátrico los grupos más afectados. Este microorganismo se transmite por la ingesta de agua contaminada con heces humanas o animales; si bien esta especie en la mayoría de los casos es inofensiva, existen algunas cepas que pueden causar graves malestares debido a la capacidad de producir toxinas similares a la toxina Shiga, siendo catalogadas como Shiga tipo 1 (Stx-1), las cuales pueden encontrarse proliferando a temperaturas de 7-50 °C y resistiendo pH ácidos (Fasano *et al.* 1995; Fedes-Salido 2004; Wang, 2007).

***Escherichia coli* 25922:** Esta cepa se ha secuenciado completamente, clasificada con un nivel de bioseguridad BSL 1, no produce serotoxinas, ni toxinas termolábiles (LT)

y se utiliza para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, aplicaciones bioinformáticas, así como controles de calidad (Tabla 4) (ATCC 2023b).

Tabla 4 Taxonomía de *Escherichia coli* (E.)

Reino	Bacteria
División	Pseudomonadota
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>Escherichia coli</i> (E.)

Bacterias Gram positivas

1.1.7 Staphylococcus aureus

Causante de intoxicación alimentaria se encuentra en una amplia variedad de alimentos como: las carnes rojas, embutidos, carne de aves de corral, huevo, ensaladas, productos de panadería; son capaces de producir enterotoxinas estafilocócicas clasificadas como (TSST-1) las cuales producen inflamación y cambios moleculares en los tejidos, provocando síntomas repentinos/violentos causante de náuseas fuertes, dolor cólico, vómitos y diarrea (Chang-Yee *et al.* 2003; Paredes-Salido *et al.* 2004; Cervantes-García *et al.* 2014).

***Staphylococcus aureus* BAA44:** Cepa farmacorresistente a Azitromicina, Cefoxitina, Ciprofloxacino, Clindamicina, entre otros. Clasificada con un nivel de bioseguridad BSL 2, es utilizada en la investigación sobre su resistencia hacia antimicrobianos, desarrollo de nuevos fármacos, estudio de las enfermedades entéricas, entre otros(Tabla 5) (ATCC 2023c).

Tabla 5 Taxonomía de *Staphylococcus aureus* (R.)

Reino	Bacteria
División	Bacillota
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i> (R.)

1.1.8 *Enterococcus faecalis*

Bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, que forma parte de la microbiota. Esta bacteria causa endocarditis, además de infecciones de vejiga, próstata, epidídimo, además farmacorresistente a varios antibióticos como nafcilina, oxacilina, dicloxaicilina, entre otros (Paredes-Salido *et al.* 2004; Conde-Estévez *et al.* 2010; Arredondo-García *et al.* 2018; Bin-Kim 2019).

***Enterococcus faecalis* 29212:** Cepa del cual su genoma ha sido secuenciado completamente, clasificada con un nivel de bioseguridad BSL 2, es utilizada para pruebas de calidad de alimentos, medicamentos y medios de cultivo (ATCC 2023a) (Tabla 6).

Tabla 6 Taxonomía de *Enterococcus faecalis*

Reino	Bacteria
División	Bacillota
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Enterococcaceae
Género	<i>Enterococcus</i>
Especie	<i>Enterococcus faecalis</i> (O.)

Antioxidantes

Los antioxidantes tienen como función neutralizar los radicales libres en las células biológicas, los cuales dañan a los organismos vivos, ocasionando estrés oxidativo. Este último está relacionado con enfermedades crónico-degenerativas. La actividad antioxidante no debe evaluarse con un solo método, por que dificulta comparar un método con otro (Munteanu *et al.* 2021).

1.1.9 Prueba ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

Esta prueba mide la capacidad de los antioxidantes para neutralizar el catión radical estable (ABTS^{•+}), un cromóforo azul-verde de máxima absorción a 734 nm, cuya intensidad disminuye en presencia de antioxidantes. ABTS^{•+} puede generarse a partir de ABTS en presencia de poderosos agentes antioxidantes (Munteanu *et al.* 2021).

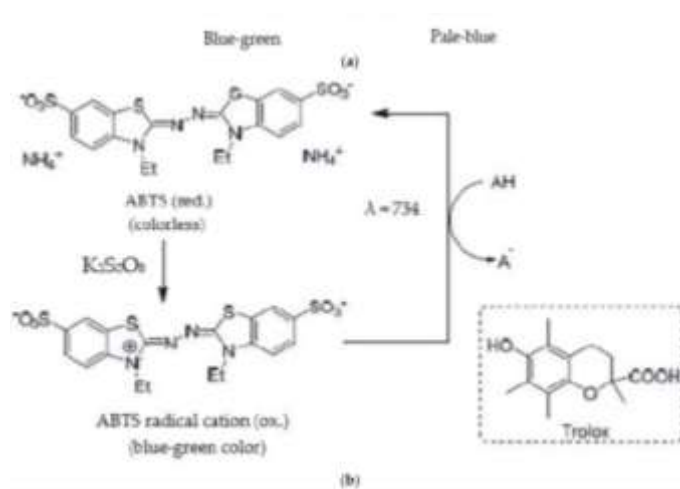


Figura 1 Esquema de la reacción de ABTS con Trolox. Imagen tomada de Moraes-de-Souza *et al.* (2021).
© 2021 by the authors. Licensed under CC BY 4.0.

1.1.10 Prueba del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo),

El radical es soluble en diferentes disolventes orgánicos, pero no en agua. La prueba de neutralización de DPPH se basa en la donación de electrones de los antioxidantes para neutralizar el radical DPPH. La reacción genera un cambio de color del DPPH medido a 517 nm, y la decoloración, nos indica la actividad antioxidante (Munteanu *et al.* 2021).

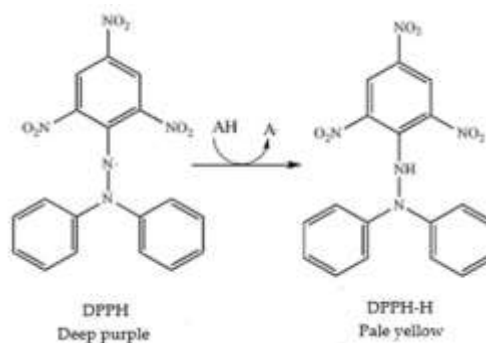


Figura 2 Esquema de la reacción de DPPH con compuestos antioxidantes. Imagen adaptada de Moraes-de-Souza *et al.* (2021). © 2021 by the authors. Licensed under CC BY 4.0.

Toxicidad

Conocer la toxicidad es muy importante para la inocuidad de los productos que se administran, y puede ser evaluada por diversos métodos. Una técnica sencilla es por medio de hemólisis, la cual puede ser ocasionada por diversos factores tales como: medicamentos, toxinas, sustancias químicas o incluso problemas genéticos, que liberan la hemoglobina y otros componentes al torrente sanguíneo, lo que desencadena una serie de respuestas adversas en el organismo.

La toxicidad de plantas medicinales puede variar dependiendo de la especie, la forma de preparación, la dosis y la condición del individuo, ya que contienen metabolitos secundarios bioactivos, con múltiples actividades biológicas de importancia médica. Sin embargo, dichos compuestos pueden ocasionar efectos nocivos sobre diversos órganos como hígado, riñones y páncreas, entre otros. Por lo tanto, es imprescindible evaluar la toxicidad estos compuestos bioactivos extraídos de las plantas para validar una administración segura (Rivas *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Un problema a nivel global es la farmacorresistencia que han desarrollado las bacterias, las cuales han evolucionado de tal manera que no responden a los tratamientos convencionales, lo que se refleja en tratamientos menos efectivos, mayores costos de cuidado médico y mayores tasas de mortalidad; que han afectado tanto el sector salud, social y económico; Por lo anterior, en este estudio se evaluó la actividad antibacteriana, antioxidante y hemolítica de plantas tradicionales de México: *Bernardia myricifolia*, *Pleurochaete luteola* y *Manfreda virginica*, como una alternativas para el tratamiento enfermedades ocasionadas por bacterias farmacorresistentes.

HIPÓTESIS

Los extractos hexánicos y metanólicos de *Pleurochaete luteola*, *Manfreda virginica* y *Bernardia myricifolia*, presentan propiedad bactericida, actividad antioxidante y una nula actividad hemolítica.

OBJETIVOS

General

- Evaluar la actividad bactericida, antioxidante, toxicidad y de los extractos de *Pleurochaete luteola* (B.), *Manfreda virginica* (L.) y *Bernardia myricifolia* (S.) sobre patógenos de importancia médica.

Objetivos específicos

- Obtener los rendimientos de los extractos hexánicos y metanólicos de *Pleurochaete luteola*, *Manfreda virginica* y *Bernardia myricifolia*.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos, sobre patógenos de importancia médica.
- Obtener el perfil fitoquímico de los extractos con actividad antibacteriana.
- Determinar el porcentaje hemolítico de los extractos con actividad antibacteriana.
- Cuantificar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos con actividad antibacteriana.
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos con actividad antibacteriana.
- Cuantificar la capacidad antioxidante de los extractos con actividad antibacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipo

- Equipo de extracción soxhlet
- Rotavapor (Yamato RE 200)
- Baño de agua (Yamato BM 100)
- Centrifuga (SelectSpin 17R)
- Espectrofotómetro (Thermo Genesys 20)
- Horno de secado (RIOSSA H-33)
- Incubadora (Felisa)
- Campana de flujo laminar (SEV CFL102)

Material biológico

1.1.11 Bacterias

Staphylococcus aureus BAA44

Enterococcus faecalis 29212

Escherichia coli 25922

1.1.12 Vegetales

Bernardia miricifolia

Manfreda virginica (L.)

Pleurochaete luteola (B.)

Recolección del material biológico

Obtención del material vegetal: Se realizó una expedición al Monumento Natural Cerro de la Silla (MNCS) y el área natural protegida (ANP) Cerro de las Mitras, Nuevo León, México. Se recolectaron las plantas: *Bernardia myricifolia*, *Pleurochaete luteola* y *Manfreda virginica*, también se tomó la georreferencia del lugar de colecta y se depositó una muestra para su clasificación botánica en el herbario de la Facultad de Ciencias

Biológicas. Las partes utilizadas de las plantas fueron las hojas para el caso de *M. virginica* y *B. myricifolia*, para el caso de *P. luteola* se utilizó la parte fotosintética del gametofito.

Tabla 7 Coordenadas de los puntos de colecta de las plantas de estudio.

Planta	Coordenada		
	N	W	msnm
<i>M. virginia</i>	25°38'56	100°15'08	505
<i>B. myricifolia</i>	25°38'58	100°15'08	804
<i>P. luteola</i>	25°38'35	100°14'39	1150

Tabla 8 Código de muestra de las plantas resguardadas en el herbario de la facultad de ciencias biológicas, UANL.

Planta	Código de muestra
<i>M. virginia</i>	25611
<i>B. myricifolia</i>	25612
<i>P. luteola</i>	MUSGO214

Figuras de las especies



Figura 3 Ejemplares de *P. luteola* hidratados.



Figura 4 Filidio de *P. luteola* hidratado.



Figura 5 Flor de *Manfreda virginica*.

Adaptado de Amole de Virginia (*Manfreda virginica*),
por pufferchung, 2021, Naturalista,
(<https://mexico.inaturalist.org/observations/85028675>).

CC BY 4.0 DEED.



Figura 6 Ejemplar de *Manfreda virginica*



Figura 7 Hoja y fruto de *Bernardia myricifolia*.

Adaptado de Oreja de Ratón (*Bernardia myricifolia*),
por kip_lary, 2023, Naturalista,
<https://mexico.inaturalist.org/observations/158138746>.

CC BY-NC 4.0 DEED.



Figura 8 Inflorescencia de *Bernardia myricifolia*.

Las cepas farmacorresistentes: Se obtuvieron del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Obtención de los extractos

Primeramente se limpió material vegetal, se secaron en oscuridad a temperatura ambiente y se trituraron. Después se realizó una extracción hexánica por Soxhlet, en la cual se mantuvo el proceso de extracción durante 5 h por 5 d, posteriormente se filtró la solución con papel filtro y se vertió en un matraz bola, se colocó en un rotavapor el cual evaporó el hexano y permanecieron los compuestos extraídos. Este extracto se llevó a desecación a través de un horno de secado, se obtuvieron los rendimientos de extracción y finalmente se colocó en un frasco ámbar, siendo almacenado a 5 °C. Al material vegetal previamente extraído con hexano se le realizó una segunda extracción con metanol repitiendo el mismo procedimiento, posteriormente se calcularon los rendimientos a partir de la siguiente formula.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{g \text{ planta seca}}{g \text{ de extracto obtenido}} \times 100$$

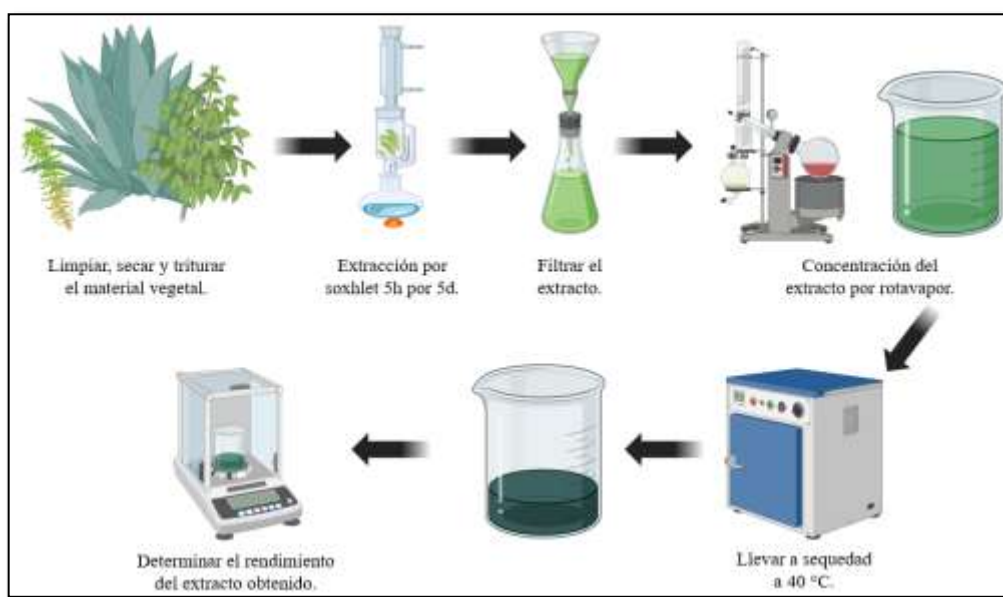


Figura 9 Procedimiento para la obtención de extractos y determinación del rendimiento

Evaluación actividad antimicrobiana

Las cepas farmacorresistentes: Se obtuvieron del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

1.1.13 Activación de las cepas bacterianas

Se realizó un cultivo de las cepas en 4 mL de caldo nutritivo, se mantuvieron durante 24 h en una incubadora para probar su esterilidad. Posteriormente, con un asa bacteriológica que se esterilizó en el mechero, se tomó una asada de la cepa y se inoculó dentro de cada uno de los respectivos tubos. El proceso se repitió para cada cepa a evaluar. Los tubos inoculados procedieron a incubarse por un período de 24 h a 37 °C.

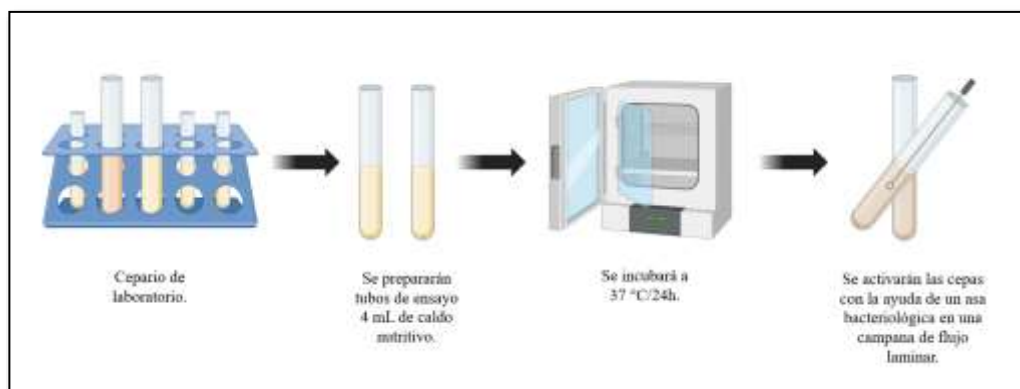


Figura 10. Procedimiento para la reactivación de las cepas bacterianas

1.1.14 Método de difusión en disco

Se inocularon las bacterias a evaluar en placas con agar Mueller-Hinton (MHA) con 100 μ L de la solución de bacterias a una concentración de 0.5% de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL) y se extendió en la superficie de la placa MHA con un asa Digrafsky. Se impregnaron los discos de papel filtro Whatman N° 42 con el extracto a estudiar, utilizando 10 μ L de extracto para cada lado y colocando 5 discos por placa, en la cual 4 tuvieron el extracto y un disco control en el centro con el solvente utilizado para disolver el extracto. Una vez realizado esto, se invirtieron las placas y se llevaron a incubación por un período de 24 h a 37 °C. Se midieron las zonas de inhibición (Hudzicki 2009). Las pruebas se realizaron por triplicado, se

obtuvieron las medias de los halos de inhibición por repetición y se aplicó una prueba de Dunnet con $p < 0.05$ para determinar la diferencia significativa.

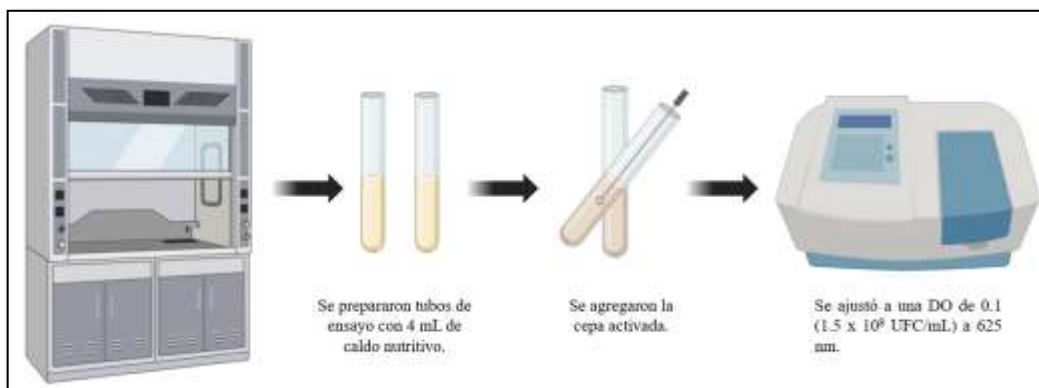


Figura 11. Preparación del inóculo para las pruebas de actividad antimicrobiana.

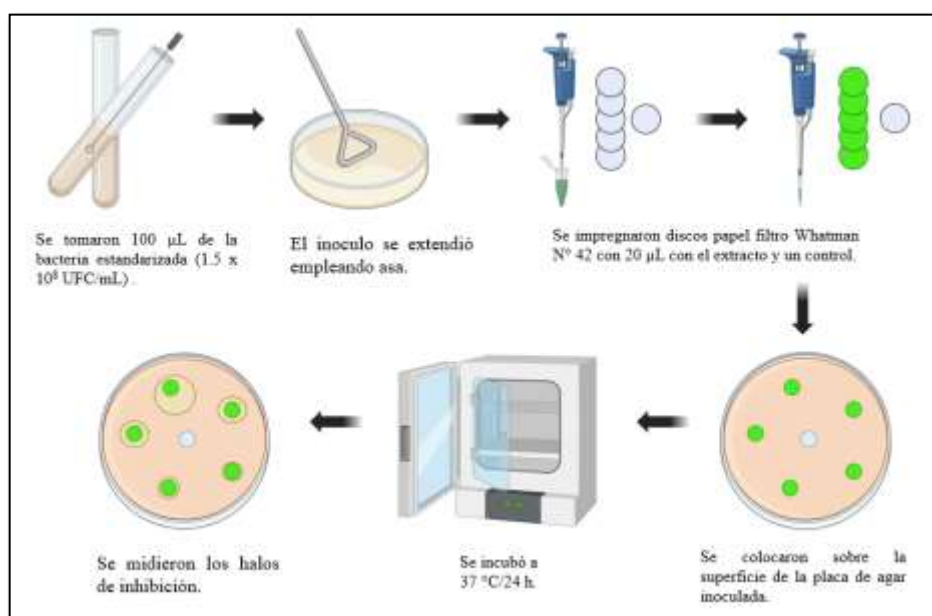


Figura 12 Prueba de difusión en disco.

1.1.15 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

A los extractos que presentaron halos de inhibición por el método de difusión en placa se les determinó la CMI, utilizando una microplaca de 96 pozos por cada cepa a estudiar. Para su procedimiento, en los pocillos numerados del 1 al 6 de la fila (A) se agregaron 100 μ L de caldo Mueller-Hinton, después se añadieron 200 μ L de extracto en

el primer pocillo. Posteriormente, se tomaron 100 μ L del primer pocillo y se colocaron en el segundo pocillo de la misma fila; esta dilución se repitió hasta llegar al pocillo 7, en el cual fueron depositados los últimos 100 μ L como desecho. De esta manera, se obtuvieron diluciones de 1:1, 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. También se agregaron los controles de referencia. En la columna 11, se agregó una solución de 100 μ L de la cepa estandarizada y 100 μ L del medio de cultivo (caldo Mueller-Hinton) para observar el crecimiento común de la bacteria. Finalmente, en la columna 12 se agregaron 100 μ L del extracto y 100 μ L del medio de cultivo (caldo Mueller-Hinton), que actuó como blanco. Esta prueba se realizó por triplicado, aplicando el mismo procedimiento con las filas B y C. En el caso de que los dos extractos a estudiar presentaran actividad antimicrobiana, se designaron las filas F, G y H para las pruebas del segundo extracto (Figura 13 y 14). Posteriormente, la microplaca se incubó por 24 h a 37 °C. (Verde-Star 2016).

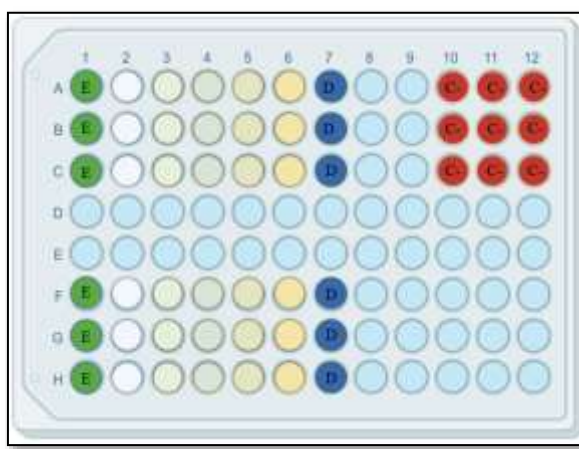


Figura 13. Representación de placa de 96 pozos y sus divisiones para las pruebas de concentración mínima inhibitoria

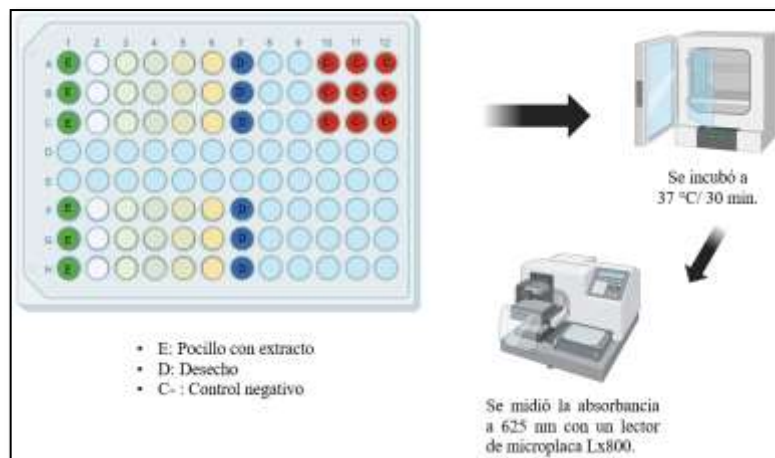


Figura 14. Metodología de la prueba de concentración mínima inhibitoria

1.1.16 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se realizó la técnica propuesta por (García-Hernández 2016) con algunas modificaciones. Después de la prueba CMI, se tomó una asada de los tratamientos que mostraron inhibición en la placa de 96 pozos y se colocaron en una caja de Petri con agar Mueller-Hinton, se dejó incubar a 36 °C durante 24 h y se observó si existía crecimiento bacteriano, determinando así, si la concentración del tratamiento era bactericida. También se realizó una segunda prueba comprobatoria por medio de goteo en el cual se tomó 15 uL de la CMI y se incubó en las mismas condiciones.

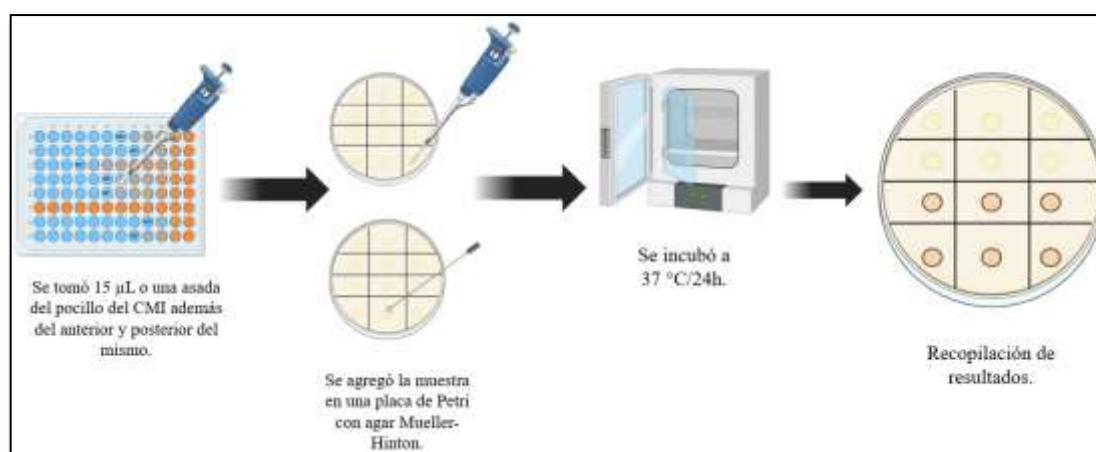


Figura 15 Metodología de la prueba de concentración mínima bactericida

Caracterización fitoquímica de los extractos

1.1.17 Alkaloides

Se realizó una prueba de Dragendorff, la cual contenía yoduro de bismuto y potasio, en la cual se colocó el extracto disuelto en etanol y se le agregaron dos gotas del reactivo generando un precipitado naranja o rojo anaranjado. Si la prueba fue positiva para alcaloides.

1.1.18 Carbohidratos

Se realizó la prueba de Antrona, en la cual se colocaron 1–2 mL del extracto disuelto en agua en un tubo de ensayo, y se vertió lentamente una solución de Antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Si en la interfaz se creó un anillo azul-verdoso o violeta, la prueba fue positiva para carbohidratos.

1.1.19 Cumarinas

Se prepararon 1–2 mL del extracto y se disolvieron en una solución de hidróxido de sodio al 10 % en agua. Si se formó una coloración amarilla, la cual desapareció al agregar ácido clorhídrico, la prueba fue positiva para cumarinas.

1.1.20 Esteroles y triterpenos

Se prepararon 1–2 mL de extracto disuelto en 1 mL de cloroformo; después se agregó una gota del reactivo de Liebermann-Burchard. Si la solución adquirió una coloración azul o morada, la prueba fue positiva para esteroles; si presentó una coloración rojiza en el transcurso de una hora, fue positiva para triterpenos, particularmente los insaturados.

1.1.21 Flavonoides

Se realizó una prueba de Shinoda, en la cual se disolvieron 1–2 mL del extracto en 1 mL de etanol; luego se agregaron unas gotas de ácido clorhídrico (HCl) y una o dos limaduras de magnesio. Si la solución tornó a color rojo intenso, la prueba fue positiva; también colores como anaranjado, verde o azul indicaron la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

1.1.22 Saponinas

En un tubo de ensayo se colocaron de 1 a 2 mL del extracto disuelto en 1 mL de agua, se agitó y se observó si se formó una espuma abundante que permaneciera durante una hora; en ese caso, la prueba fue positiva.

1.1.23 Quinonas

Se prepararon 2 mg del extracto y se añadieron de 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4); si la solución se tornó de color rojo, la prueba fue positiva para quinonas. Para confirmar, se añadieron de 2 a 3 gotas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (hidrosulfito de sodio) al 5 %, lo que decoloró la solución, y ésta retornó a su tono rojo al añadir 2–3 gotas de agua oxigenada al 30 %.

1.1.24 Sesquiterpenlactonas:

Se prepararon 3–4 mL del extracto y se añadieron de tres a cuatro gotas del reactivo de Baljet. Si la solución se tornó de una coloración naranja o rojo oscuro, la prueba fue positiva para sesquiterpenlactonas (Rivas-Morales *et al.* 2016).



Figura 16. Procedimiento general de la caracterización fitoquímica de los extractos.

Actividad antioxidante

1.1.25 Ensayo con ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)):

Para la prueba de actividad antioxidante por la inhibición del radical de ABTS, se siguió la metodología de García-Hernández (2016) con algunas modificaciones. Se preparó el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a partir de la solución de ABTS (Sigma-Aldrich, 7 mM). Para esto, se pesaron 19.1 mg de ABTS y se añadieron 3.31 mg de persulfato de potasio. Después, se llevó a una solución de 5 mL con agua destilada y se dejó incubar en oscuridad durante 16 h a 37 °C. Posteriormente, se tomó una alícuota de la solución, se llevó a un espectrofotómetro donde se leyó y ajustó la absorbancia en un rango de 0.7 ± 0.05 a una longitud de onda de 734 nm, utilizando etanol como blanco. Para la prueba, se depositaron 990 μL del reactivo $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y 10 μL del tratamiento en una celda a diferentes concentraciones las cuales fueron de 10, 7, 5, 3, 1 y 0.5 mg/mL, posteriormente se tomó una lectura de absorbancia en un espectrofotómetro en el minuto 0 (antes de la reacción) y en los minutos 1, 4 y 6. Por último, se realizó una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich) y se determinó la equivalencia extracto-Trolox. Las pruebas se realizaron por triplicado.

1.1.26 Ensayo con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Se preparó una solución madre del radical DPPH a 1.3 mM. Para esto, se tomaron 12.8 mg del reactivo DPPH (Sigma-Aldrich) y se llevó a una solución de 25 mL con metanol absoluto. Posteriormente, se preparó una solución de trabajo tomando una alícuota de 2.5 mL de la solución madre y se ajustó a una solución de 25 mL con metanol. Para la prueba de captura de radicales, se depositaron 600 μL de solución DPPH en una celda y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro monocromador. Después, se agregaron 100 μL de la muestra a diferentes concentraciones las cuales fueron de 10, 7, 5, 3, 1 y 0.5 mg/mL y se midió la absorbancia en el min 30, obteniendo así la absorbancia en el minuto 0 y 30, a una longitud de onda de 517 nm. Por otra parte, se realizó una curva de calibración de Trolox y se determinó la equivalencia extracto-Trolox. Las pruebas se realizaron por triplicado. Se preparó una curva de TROLOX® (Sigma-Aldrich) 1M y se

realizó una curva de calibración según las diferentes concentraciones de 50 a 375 mM de Trolox. Se determinó el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{abs final} - \text{abs inicial}}{\text{abs inicial}} \times 100$$

Se preparó una curva de calibración para ambas pruebas de actividad antioxidante a partir de Trolox 10 mM, para ello pesaron 62.57 mg de TROLOX® (Sigma-Aldrich) y se aforó a un volumen de 25 mL con etanol absoluto, posteriormente se tomó 2.5 mL de la solución madre de TROLOX y se aforó a 25 mL llevando así la solución a una molaridad de 1 mM; de esta solución madre se tomaron alícuotas para preparar soluciones a diferentes concentraciones de Trolox 0-100 uM y se obtuvo el valor del porcentaje de inhibición de radicales por medio de la misma fórmula. Con estos datos se realizó una prueba Probit obteniendo así el IC₅₀ mediante el programa SPSS, posteriormente se obtuvo la equivalencia en Trolox mediante la siguiente formula.

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

Toxicidad

1.1.27 Ensayo de hemólisis

Esta prueba tiene la finalidad de cuantificar la actividad hemolítica de los extractos obtenidos para esto primero debe de prepararse la solución buffer fosfato salino (PBS), la solución de extracto metanólico o hexánico y el paquete globular (P.G.), las pruebas se realizaron por triplicado tomando los porcentajes de hemólisis y se comparan las medias por prueba de Dunnet p<0.05. **Para la preparación del P.G. por prueba:** Primero se obtiene una muestra de 2.5 mL de sangre O+ y se coloca en un tubo de ensayo después se centrifuga a 3,000 rpm durante 15 min posteriormente se marca el nivel de la solución y se extrae el sobrenadante, se realizan 3 lavados con PBS, para esto se vierte la solución al tubo de ensayo hasta el nivel original y se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 min, después se extrae el sobrenadante y se vuelve a colocar PBS al nivel original, por último se toman los 2.5 mL de solución sanguínea y se vierten a un matraz de aforación de 10 mL y por último se afora con PBS. **Para la preparación del extracto suspendido:** Primero se pesaron 5 mg de los extractos que mostraron actividad antimicrobiana y se disolvieron en

1 mL de solvente, siendo 1 mL de metanol para los extractos metanólicos, con esto obtendremos una solución a 5,000 ppm. **Prueba de hemólisis:** Se utilizó una microplaca de 96 pozos, y tubos cónicos de 1.5 µL. Primero se colocaron dentro de 6 tubos cónicos de 1.5 µL, las diferentes cantidades de PBS, Posteriormente el extracto y por último el P.G. en ese orden con las concentraciones marcadas en la Tabla 9.

Tabla 9 Concentración de las soluciones para pruebas de hemólisis.

Concentración (ppm)	Tratamiento (µL)	PBS (µL)	P.G. (µL)
1000	25	975	250
800	20	980	250
600	15	985	250
400	10	990	250
200	5	995	250
100	2.5	997.5	250

Posterior a preparar los tratamientos, se llevaron los tubos cónicos de 1.5 µL a la incubadora durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente se realizó la centrifugación de los tubos cónicos a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C, después se tomaron 100 uL de cada tubo y se depositaron en la microplaca de 96 pocillos para determinar el porcentaje de hemólisis mediante una lectura de absorbancia a 550 nm.

Se realizó una preparación **blanco** en 6 tubos cónicos con las siguientes concentraciones

Tabla 10 Concentración de las soluciones del control blanco de la prueba de hemólisis.

Tratamiento (µL)	PBS (µL)	PBS (µL)
25	975	250
20	980	250
15	985	250
10	990	250
5	995	250
2.5	997.5	250

Por último, se realizó una preparación de **control positivo** en 6 tubos cónicos de 1.5 µL utilizando 1 ml de agua destilada y 250 µL de paquete globular

Después de preparar el control positivo se llevó a la incubadora durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Posteriormente se realizó la centrifugación de los tubos cónicos a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C, después se tomaron 100 µL de cada tubo y se depositaron en la microplaca de 96 pocillos para determinar el porcentaje de hemólisis mediante una lectura de absorbancia a 550 nm (Galido-Contreras 2022).

Interpretación de potencial hemolítico: Para su interpretación se utilizaron los valores de Mesdaghinia *et al.* (2019) para determinar el potencial hemolítico de los extractos probados.

Tabla 11 Interpretación de potencial hemolítico.

Hemólisis (%)	Actividad hemolítica
>5	Hemolítico
2-5	Ligeramente hemolítico
<2	No hemolítico



Figura 17 Preparación del paquete globular para la prueba de hemólisis.

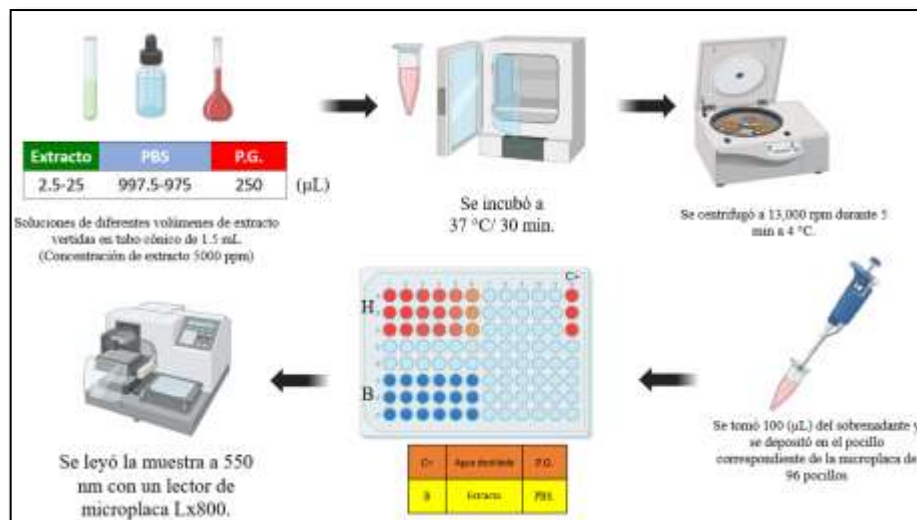


Figura 18 Prueba de hemólisis, H: pocillos de prueba de hemólisis, C+: Control positivo, B: Blanco

Análisis de datos

Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para observar la normalidad de los datos, después un análisis estadístico utilizando la prueba ANOVA de un factor, posteriormente se realizó una prueba post-hoc según el tipo de prueba.

Tabla 12 Tipo de respuestas registradas en las pruebas y modelo estadístico utilizado.

Respuesta para estadístico			
Prueba	Respuesta	Respuesta comparativa	Modelo estadístico
Difusión en disco	Halo de inhibición del extracto	Halo de inhibición del solvente C-	Dunnet
Concentración mínima inhibitoria (CMI)	Inhibición de crecimiento bacteria	Negativo (crecimiento)	Dunnet
Concentración mínima bactericida (CMB)	Presencia o ausencia de crecimiento	Negativo (crecimiento)	Dunnet
Hemólisis	Porcentaje de hemólisis	Negativo (P.G. hemolizado)	Dunnet
DPPH	Porcentaje de inhibición	Respuesta esperada de inhibición absoluta	Probit (razón de verosimilitud)
ABTS	Porcentaje de inhibición	Respuesta esperada de inhibición absoluta	Probit (razón de verosimilitud)

RESULTADOS

Rendimiento de extracción

Tabla 13 Rendimientos de extracción por soxhlet de las plantas en estudio

Material vegetal	Rendimiento del extracto (%)	
	Hexánico	Metanólico
<i>B. myricifolia</i>	4.3	25.2
<i>M. virginica</i>	6.8	10.9
<i>P. luteola</i>	1.5	2.1

Caracterización fitoquímica

Tabla 14 Caracterización fitoquímica de los extractos hexánicos y metanólicos de *B. myricifolia*, *M. virginica* y *P. luteola*.

Prueba química	Plantas en estudio					
	<i>B. myricifolia</i>		<i>M. virginica</i>		<i>P. luteola</i>	
	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico
Esteroles y triterpenos	+	+	-	-	-	+
Curmarinas	+	-	-	+	+	+
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	+	+	+
Quinonas	-	-	-	+	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	-	+	+	-	-
Taninos	-	+	+	-	-	-
Antrona	+	+	-	+	-	+
Alcaloides	-	-	-	+	-	+

Presencia del metabolitos = +, Ausencia de metabolitos = -

Prueba de difusión en disco

Tabla 15 Inhibición (mm) de los extractos metanólicos y hexánicos de las plantas de estudio contra *S. aureus* BAA44 y *E. faecalis* 29212.

Bacteria	Plantas de estudio					
	<i>B. myricifolia</i>		<i>M. virginica</i>		<i>P. luteola</i>	
	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico
<i>E. coli</i> 25922	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> BAA44	0	10 ± 0.3	0	8 ± 0.2	0	9 ± 0.1
<i>E. faecalis</i> 29212	0	0	0	0	0	4.7 ± 0.3

n: 3

Solo se muestran los extractos bioactivos del punto anterior (metanólicos)

Tabla 16 Inhibición de los extractos metanólicos de las plantas en estudio contra *S. aureus* BAA44 y *E. faecalis* 29212.

Extracto metanólico	Halos de inhibición (mm)	
	<i>S. aureus</i> BAA44	<i>E. faecalis</i> 29212
<i>B. myricifolia</i>	10 ± 3	-
<i>M. virginica</i>	8 ± 0.2	-
<i>P. luteola</i>	9 ± 0.1	4.7 ± 0.3

n = 3 (prueba Dunnet con una significancia p<0.05).

Toxicidad por hemólisis

Tabla 17 Resultados de las pruebas de toxicidad por hemólisis de los extractos metanólicos de las plantas de estudio con una significancia $p < 0.05$ en prueba Dunnet.

Concentración (ppm)	Hemólisis (%)		
	<i>P. luteola</i>	<i>B. myricifolia</i>	<i>M. virginica</i>
1000	0	0	100 ± 0
500	0	0	100 ± 0
250	0	0	100 ± 0
125	0	0	100 ± 0
62	0	0	30.9 ± 2.7
31	0	0	3.2 ± 0.44

n: 3 (prueba Dunnet con una significancia $p < 0.05$), desviación estándar: ±.

Cantidad mínima inhibitoria (CMI) y cantidad mínima bactericida (CMB)

Tabla 18 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos metanólicos de las plantas de estudio contra *S. aureus* BAA-44 y *E. faecalis* 29212.

Extracto metanólico	Actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i> BAA44		Actividad antibacteriana contra <i>E. faecalis</i> 29212	
	CMI mg/mL	CMB mg/mL	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>P. luteola</i>	2.5 ± 0	5 ± 0	2.5 ± 0	5 ± 0
<i>B. myricifolia</i>	2.5 ± 0	5 ± 0	-	-

n = 3 (prueba Dunnet con una significancia $p < 0.05$). desviación estándar: ±.

Prueba de actividad antioxidante

Tabla 19 Actividad antioxidante (IC_{50}) de los extractos metanólicos por los métodos DPPH y ABTS.

Extracto metanólico	DPPH (IC_{50}) (mg/mL))	ABTS (IC_{50}) (mg/mL)
<i>B. myricifolia</i>	3.2 ± 0.05	1.9 ± 0.10
<i>M. virginica</i>	1.4 ± 0.13	6.7 ± 0.18
<i>P. luteola</i>	4.7 ± 0.50	18.9 ± 0.34

Valores de IC_{50} calculados mediante análisis Probit con una significancia $p < 0.95$, n: 3, desviación estándar: ±.

Tabla 20 Actividad antioxidante IC₅₀ de las curvas de calibración en DPPH y ABTS.

Compuesto	DPPH IC₅₀ (µg/mL)	ABTS IC₅₀ (µg/mL)
TROLOX® (Sigma-Aldrich)	-	13.6 µM
Ácido Gálico	34.7 µM	-

Valores de IC₅₀ calculados mediante análisis Probit con una significancia p < 0.95, n: 3

Tabla 21 Actividad Equivalente de Ácido Gálico (EAG) y la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) de los extractos metanólicos.

Extracto metanólico	EAG mg/100g de planta	TEAC mg/100g de planta
<i>P. luteola</i>	0.73 ± 0.07	0.07 ± 0.00
<i>M. virginica</i>	1.06 ± 0.01	0.20 ± 0.00
<i>B. myricifolia</i>	2.47 ± 0.23	0.72 ± 0.03

n:3, desviación estándar: ±.

DISCUSIÓN

Rendimiento de extracción

La extracción más baja fue de *Pleurochaete luteola* esto se debe a que estos vegetales destacan por ser organismos que presentan parénquima simple y estructuras de células muertas lo cual lo caracteriza con una menor densidad de metabolitos (Velázquez-Castillo *et al.* 2023). Por otra parte, se observa que el mayor rendimiento de extracción hexánica se dio con *Manfreda virginica* dado a su naturaleza de agave los cuales presentan considerables cantidades de ceras (Monja-Mio *et al.* 2019). Por último el mayor rendimiento de extracción metanólica fue por parte de *B. myricifolia* el cual nos indica una alta concentración de compuestos polares.

Caracterización fitoquímica

P. luteola

En comparación con el hidrodestilado de *P. squarrosa* de (Gonca *et al.* 2014), se encontró la similitud con nuestro extracto metabólico en presencia de esteroides y triterpenos con diferencia en cuestión de los otros metabólicos encontrados a los de nuestro extracto como lo son curmarinas, sesquiterpenlactonas, antronas y alcaloides esto podría atribuirse al tipo de extracción, ya que los hidrodestilados suelen arrastrar compuestos volátiles el cual excluye a las curmarinas, también se puede deber a la misma producción de metabolitos secundarios intrínsecos de la especie. Por último también está el factor del estrés ambiental dado a que los ejemplares del estudio de Gonca y colaboradores pertenecen a Maçka (2014), Trabzon, Turquía, las cuales son zonas de condiciones frías y húmedas, además de que su vegetación se presenta como bosque de pino mientras que el clima en donde se encuentran nuestros ejemplares presenta un clima árido, temperaturas más elevadas y menos húmedas, esto representa tanto diferencias de estos biótico, como abiótico. Finalmente, los resultados discrepan entre nuestro extracto metanólico y los reportados por Jiménez *et al.*, 2019 ya que su estudio reporta presencia de fenoles en extractos acuosos y etanólicos de la misma especie, esto puede deberse a la especificidad de los fenoles por los solventes o por los factores de estrés mencionados anteriormente.

M. virginica

En varios estudios se ha reportado la presencia de saponinas en el género de *Manfreda* sin embargo los extractos de nuestros ejemplares no presentaron saponinas comparando los estudios anteriores que reportan estos compuestos, tanto de manera tradicional como in vitro (Rose 1899; Verhoek 1978; Montemayor *et al* 2008). Podemos observar que están enfocados en las raíces y rizomas de las plantas, a diferencia de nuestro estudio el cual se enfocó en las hojas fotosintéticas (vivas) de los ejemplares, esto también aplica en la ausencia de terpenos dentro de nuestros extractos en comparación por los reportados por Marker *et al.* 1943 para *M. virginica* los cuales también fue un estudio de elucidación de estructuras extraídas de las raíces de la planta.

Actividad antibacteriana

Los extractos hexánicos no presentaron actividad antibacteriana, así mismo ningún extracto metanólico presentó actividad contra *E. coli* 25922. La actividad antibacteriana de *P. luteola* obtenidos en nuestro estudio mostraron comportamientos similares con los reportados por Gonca *et al.* (2014) para el extracto acuoso de la especie hermana *P. squarrosa*, donde se reportó una concentración mínima inhibitoria de 4.65 mg/mL contra *S. aureus* 25923, en comparación, nuestro extracto metanólico presenta una CMI de 2.5 mg/mL, además también reportamos una CMB de 5 mg/mL contra *S. aureus* BAA-44, además se observó actividad antibacteriana contra *E. faecalis* 29212, con una CMI de 2.5 mg/ml y una CMB de 5 mg/mL.

Toxicidad por hemólisis

Los extractos metanólicos no presentaron actividad hemolítica exceptuando el extracto de *M. virginica*, el cual muestra altos valores de actividad hemolítica a un valor de ligeramente hemolítico en la última concentración de 31 ppm. Esto puede deberse a la presencia de quinonas las cuales pueden presentar actividad hemolítica (Exeni-Matiuzzi 2020). Los bajos valores de hemotoxicidad resultados del extracto metanólico de *P. luteola* pueden compararse con los reportados por Basile *et al.* (1998), quienes evaluaron la toxicidad del extracto cetónico de *P. squarrosa* en ratones Balb C a los que se les

administró una dosis de 1 g/kg del extracto cetónico y no se observaron signos de toxicidad ni cambios en el comportamiento de los animales tratados.

Actividad antioxidante

Los extractos metanólicos presentaron actividad antioxidante con un IC_{50} entre 1.8-4.3 mg/mL para la prueba de DPPH y 1.9-18.9 mg/mL en la prueba de ABTS. Lo anterior se reflejó en equivalentes de ácido gálico (EAG) entre 0.73 y 2.47 mg por 100 g de planta y en equivalentes de Trolox (TEAC) con 0.72-0.07 mg por cada 100 g de planta. Los extractos de *B. myricifolia* y *M. virginica* presentaron una mayor capacidad reductora en las pruebas de DPPH y ABTS en comparación con el extracto de *P. luteola*, esto puede deberse a la presencia de flavonoides y/o quinonas en el caso del extracto de *M. virginica* los cuales suelen presentar actividad antioxidante, la actividad presentada por *P. luteola* se complementa el estudio de Jiménez *et al.*, 2019 el cual nos reporta actividad antioxidante del extracto etanólico de la misma especie expresando su capacidad reductora de manera cualitativa.

CONCLUSIONES

Los extractos de las plantas de estudio presentaron rendimientos de extracción diferentes. El mayor rendimiento de extracción se dio con la extracción metanólica de *B. myricifolia* con un 25 %.

Se realizaron los tamizajes fitoquímicos de los extractos *Bernardia myricifolia* (s.) y *Manfreda virginica* (l.) obtenidos por primera vez a nivel de especie.

Los extractos hexánicos de las plantas en estudio no presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias evaluadas.

Los extractos metanólicos de *P. luteola* y *B. myricifolia* presentaron actividad contra *S. aureus* BAA44 con una CMI de 2.5 mg/mL y una CMB de 5 mg/mL, adicionalmente el extracto metanólico de *P. luteola* presento actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* 29212 con las mismas concentraciones de CMI y CMB.

El extracto metanólico de *M. virginica* mostró una alta actividad hemolítica a moderada en todas las concentraciones evaluadas siendo del 100% en concentraciones de 1000 a 62 ppm y siendo ligeramente hemolítica a una concentración de 31 ppm.

Los extractos bioactivos de las plantas en estudio presentaron diferencias notables en su actividad antioxidante probablemente debido a los compuestos presentes en las mismas como lo son los flavonoides en *M. virginica*, esteroles y/o triterpenos en el caso de *B. myricifolia* y *P. luteola*.

PERSPECTIVAS

Los extractos metanólicos de *P. luteola* y *B. myricifolia* presentan una alternativa para el desarrollo de fármacos dado a sus actividades antibacterianas y su baja actividad hemolítica, además del considerable rendimiento de extracción por parte de *B. myricifolia*. Por otro lado *M. virginica* presenta una opción para aplicarse como antioxidante coadyuvante en fármacos y/o suplementos alimenticios. Por último, en base a todas las características benéficas, el extracto metanólico de *B. myricifolia* es una alternativa para continuar con la investigación como un posible fármaco antibacteriano y/o coadyuvante antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Arredondo-García, J., Echeguren-Flores, A., Arzate-Barbosa, P., Medina-Cortina, J. 2018. Susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* y *faecium* en un hospital de tercer nivel. <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2018/lip182d.pdf>
- ATCC. (2023a). *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz 29212 TM. <https://www.atcc.org/products/29212>
- ATCC. (2023b). *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers 25922 TM. <https://www.atcc.org/products/25922>
- ATCC. (2023c). *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach BAA-44 TM. <https://www.atcc.org/products/baa-44>
- Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Lavitola, A., Castaldo-Cobianchi, R. (1998). Antibacterial activity in *Pleurochaete squarrosa* extract (Bryophyta). International Journal of Antimicrobial Agents. DOI: 10.1016/S0924-8579(98)00028-4. ISSN: 09248579.
- Cervantes-García, E., García-González, R., Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2014; 61 (1): 28-40.
- Chang-Yee, MacDonald, B., Peacock, J. 2003. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. Medicine (Baltimore. 2003, 82:322-332. 10.1097/01.md.0000091185.93122.40
- CONABIO. (2020). Plantas medicinales <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Cd. de México. México. Consultado el 3 de noviembre del 2023.
- CONABIO. Amole de Virginia, *Manfreda virginica*. (2019a). <https://enciclovida.mx/especies/191559.pdf?from=>. Consultado el 22 de febrero del 2024.

- CONABIO. Oreja de ratón, *Bernardia myricifolia*. (2019b). <https://enciclovida.mx/especies/148632.pdf?from=>. Consultado el 22 de febrero del 2024.
- Conde-Estévez, D., Sorli, L., Morales-Molina, J., Knobel, H., Terradas, R., Mateu-de Antonio, J., Horcajada, J., Grau, S. (2010). Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volume 28, Issue 6, 2010, Pages 342-348, ISSN 0213-005X, <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.011>.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., Radilla, C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista Chilena de Nutrición. Rev Chil Nutr Vol. 42, N°2, junio 2015.
- Delgadillo-Moya, C. (2021). The ethnobotany of bryophytes in Mexico. Consultado el 15 de octubre 2023
- Delgadillo-Moya, C. 2014. Biodiversidad de Bryophyta (musgos) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Consultado el 26 de mayo del 2025. <https://doi.org/10.7550/rmb.30953>. <https://www.researchgate.net/publication/348170082>
- Ernst, M., Grace, O., Saslis-Lagoudakis, H., Nilsson, N., Simonsen, H., Ronsted, N. 2015. Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.025>
- Exeni-Matiuzzi, C. (2020). *Diseño, síntesis y actividad biológica de análogos de naftoquinonas naturales* [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales]. Repositorio Institucional UBA. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6753_ExeniMatiuzzi
- Fasano, A., Noriega, F., Maneval, F., Chanasongcram, S., Russell, R., Guandalini, S., Levine, M. (1995). Shigella Enterotoxin 1: An Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a Active in Rabbit Small Intestine In Vivo and In Vitro. J Clin Invest. 1995 Jun;95(6):2853-61.
- Gattinger, A. (1894). The medicinal plants of Tennessee. Nashville: Francis M. Paul.

- Gonca, T., Büsra, Y., Turan, Ö., Nevzat, B., Nurettin, Y., Sengül-Alpay, K. (2014). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Tortella inclinata* var. *Densa*, *T. tortusa* and *Pleurochaete squarrosa*. Asian Journal of Chemistry. DOI: 10.14233/ajchem.2014.15618. ISSN: 09707077.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American society for microbiology. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-DiffusionSusceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>.
- Islam, S., Ara, H., Ishtiaq-Ahmad, K., Uddin, M. (2019). A review on medicinal uses of different plants of euphorbiaceae family. https://www.researchgate.net/publication/331897804_A_REVIEW_ON_MEDICINAL_USES_OF_DIFFERENT_PLANTS_OF_EUPHORBIACEAE_FAMILY
- Jabbari-Shiadeh, S., Pormohammad, A., Hashemi, A., Parnian, L. 2019. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.2147/IDR.S206084?needAccess=true>
- Jacobs, M., Burlage, H. 1958. Index of plants of North Carolina with reputed medicinal uses. Henry M. Burlage.
Jiménez, I., Álvarez, M. Suárez, G., Zampini, I. Isla, M. 2019. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES DE BRIOFITAS COLECTADAS EN EL NOA. XIV Jornadas Internas de Comunicaciones en Investigación Docencia y Extensión. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Tucumán. ISSN 2591-5819
- López-Santiago, J. (2015). Plantas útiles del municipio de san pablo macuiltianguis, Oaxaca. Tesis de licenciatura. Universidad de la Sierra Juárez. Oaxaca. Mexico.
- Marker, R., Wagner, R., Ulshafer, P., Wittbecker, E., Goldsmith, D., Ruof, C. 1943. Sterols. CLVII. Sapogenins. LXM.' Isolation and Structures of Thirteen New Steroidal Sapogenins. New Sources for Known Sapogenins. Journal of the American Chemical Society 1943, 65, 6, 1199-1209

- Mesdaghinia, A., Pourpak, Z., Naddafi, K., Nodehi, RN, Alizadeh, Z., Rezaei, S., Faraji, M. (2019). An in vitro method to evaluate hemolysis of human red blood cells (RBCs) treated by airborne particulate matter (PM10). DOI: [10.1016/j.mex.2019.01.001](https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.01.001)
- Molina-López, J., Eslava-Campos, C. (2015) Escherichia coli Diarrogénica. <https://microypara.facmed.unam.mx/index.php/escherichia-coli-diarrogenica/>
- Monja-Mio, K., Escalante-Erosa, F., Eb-Puc, X., Herrera-Alamillo, M., Robert, M. 2019. Epicuticular wax analysis of wild and agronomically important Agave species. *Phytochemistry Letters*, 34, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.10.004>
- Montemayor, C., García-Escamilla, E., Rivas-Paniagua, E., Silva-Galeana, L. (2008). Diccionario del náhuatl en el español de México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2008. p. 26.
- Moraes-de-Souza, R., de Almeida, L. C., da Silva, M. F., & Costa-Lotufo, L. V. (2021). Antioxidant mechanisms of natural products: A review of their modulation of oxidative stress and cytoprotective properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Moreno-Pérez, G., Narváez-González, H. y González-Trujano, M. (2020). Plantas medicinales para el alivio del dolor. Disponible en: https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/71_2/PDF/10_71_2_1231_PlantasMedicinales-L.pdf. Consultado el 12 de agosto del 2023
- Munteanu I, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 25;22(7):3380. doi: 10.3390/ijms22073380. PMID: 33806141; PMCID: PMC8037236
- Núñez, A. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública*. 2011; 37 (suppl.): 644-60.
- Orellana, R. (2012). La que se mancha con el sol. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY).

https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2012/2012-03-15-Orellana-La-que-se-mancha-con-el-sol.pdf. Consultado el 22 de febrero del 2024

- Organización Mundial de la Salud. (2005). MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO. Tercera edición. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- Palmer 1898. Mexico. Coahuila, Saltillo and vicinity, 16-30 April 1898, E. Palmer 93y2.(U.S. National Herbarium)
- Paredes-Salido, F., Roca-Fernández, J. (2004). Infecciones gastrointestinales Tipos, diagnóstico y tratamiento. Offarm. 2004;23:100-6.
- Red de Herbarios del Noreste de México, *Bernardia myricifolia* (Scheele) Watson. (2022b).
- <https://herbanwmex.net/portal/taxa/index.php?taxon=18880&clid=200>. Consultado el 22 de febrero del 2024.
- Red de Herbarios del Noreste de México, *Manfreda virginica* (L.) Salisb. ex Rose.(2022a).<https://herbanwmex.net/portal/taxa/index.php?taxon=Manfreda+virginica&formsubmit=Search+Terms>. Consultado el 22 de febrero del 2024.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M., Verde-Star, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica 1ra. Edición (436 páginas). ISBN: 978-84-944673-7-0, DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>. OmniaScience (Omnia Publisher SL) 2016 ISBN:9788494467370.
- Rose, J. (1899). Notes on useful plants of Mexico. Cont. U.S. Natl. Herb. 5: 209-259.
- Sahagun B. 1938. Historia General de las cosas de Nueva España. Editorial Pedro Robredo. Calle de Justo Sierra No. 41. México, D.F.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2021). Plantas medicinales de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>. Consultado el 12 de agosto del 2023.
- Taddei, G., Santillana, M., Romero, J., Romero, M. (1999), “Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar”, Salud Pública de México, 41:216-220.
- Taylor, L. (1940). Plants used as curatives by certain southeastern tribes. Cambridge, Mass.: Botanical Museum of Harvard University.

- Vargas-Vizuet, A., Lobato-Tapia, C., Tobar-Reyes, J., Solano-De la Cruz, M., Ibáñez-Marínez, A., Romero-Fernández, A., (2022). Plantas medicinales utilizadas en la región de Teziutlán, Puebla, México. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. ISSN 0717 7917.
- Velázquez-Castillo, E. 2023. "CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA BRIOFLORA EN EL CERRO DE LA SILLA, NUEVO LEÓN, MÉXICO. "Tesis de licenciatura" Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Nuevo León, México.
- Velazquez-Meza, M.E.; Galarde-López, M.; Cornejo-Juárez, P.; Carrillo-Quiroz, B.A.; Velázquez-Acosta, C.; Bobadilla-del-Valle, M.; Ponce-de-León, A.; Alpuche-Aranda, C.M. Multidrug-Resistant *Staphylococcus* sp. and *Enterococcus* sp. in Municipal and Hospital Wastewater: A Longitudinal Study. *Microorganisms* 2024, 12, 645. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040645>
- Veljić, M., Tarbuk, M., Marin, P., Ćirić, A., Soković, M., Marin, M. (2008).Antimicrobial Activity of Methanol Extracts of Mosses from Serbia. *Pharmaceutical Biology*, 46:12, 871-875, DOI: 10.1080/13880200802367502
- Wamucii. 2023a. *Bernardia myricifolia* Uses and Benefits. <https://www.selinawamucii.com/plants/euphorbiaceae/bernardia-myricifolia/#uses-and-benefits>
- Wamucii. 2023 a,b. *Bernardia mexicana*. Uses and Benefits. <https://www.selinawamucii.com/plants/euphorbiaceae/bernardia-mexicana/>
- Wang, L., Li, Y., Mustapha A. (2007). Rapid and Simultaneous Quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in Ground Beef by Multiplex Real-Time PCR and.
- Zamora, J. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr.* 2007; 34 (1): 17-26.