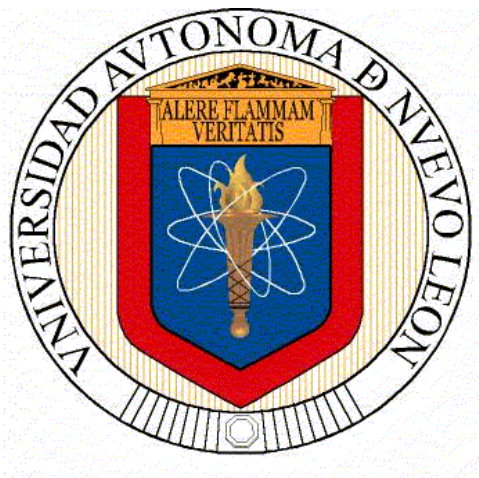


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA
MICROORGANISMOS FARMACORRESISTENTES DEL GRUPO
ESKAPE**

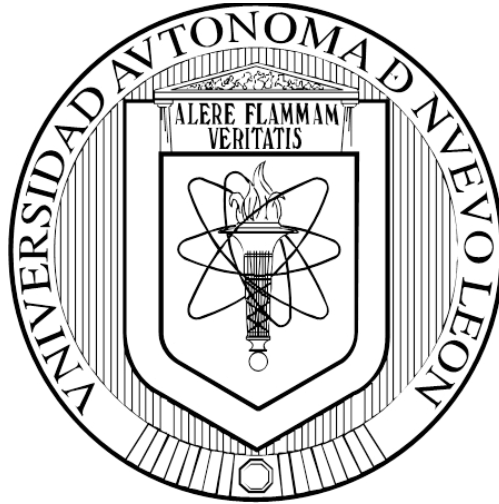
POR

DAVID ALEJANDRO HERNÁNDEZ MARÍN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

JULIO 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA
MICROORGANISMOS FARMACORRESISTENTES
DEL GRUPO ESKAPE**

POR

L.A.Q.B DAVID ALEJANDRO HERNÁNDEZ MARÍN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

JULIO 2015

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA
MICROORGANISMOS FARMACORRESISTENTES DEL GRUPO ESKAPE

COMITÉ DE TESIS



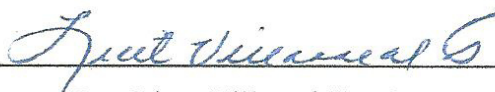
Dr. Eduardo Sánchez García
DIRECTOR



Dra. Catalina Leos Rivas
SECRETARIO



Dra. Catalina Rivas Morales
VOCAL



Dra. Licet Villareal Treviño
VOCAL



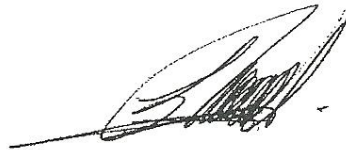
Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
VOCAL

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA
MICROORGANISMOS FARMACORRESISTENTES DEL GRUPO ESKAPE

DIRECCIÓN DE TESIS



Dr. Eduardo Sánchez García
DIRECTOR



M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque
DIRECTOR EXTERNO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

A mi familia principalmente por todo el apoyo brindado durante este tiempo.

Al Dr. Eduardo Sánchez García y al M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque por la confianza brindada para la realización de esta investigación. Así mismo les agradezco su apoyo y asesoramiento durante estos años.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (El maestro Sergio, Ray, Miza, Tomás, Vicky) y al Laboratorio de Análisis Instrumental del Centro de Ciencias Básicas de la UAA (Carmelita, Andrés, Fery) quienes me brindaron todo su apoyo para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi Madre, por su apoyo, sus consejos y el tiempo brindado a pesar de la distancia.

A mi Padre, ya que pesar de las dificultades y su situación siempre ha estado ahí.

A mis hermanos, por ser parte de mi vida.

A mi Familia Directa y Política.

A todos mis amigos, que en este tiempo me apoyaron; el Doc, el maestro Sergio, Duque, Carmelita, Luis, Miza, Ray, Tomas, Vicky, Armando, Rafa, Abraham, Fery y Andrés.

A ella por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia y las dificultades.

Te quiero Laura.

Gracias a todos, por estar al pendiente de mi persona y mí trabajo de investigación.

Gracias a todos ustedes soy lo que soy. Gracias de nuevo.

ESTA INVESTIGACIÓN SE LLEVÓ A CABO EN

El Laboratorio de Química Analítica, de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N. L., México y en el Laboratorio de Análisis Instrumental, del Centro de Ciencias Básicas, en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México bajo la dirección del Dr. Eduardo Sánchez García y la asesoría del M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 556587.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIAS	V
ESTA INVESTIGACIÓN SE LLEVÓ A CABO EN	VI
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 El sistema de salud y el impacto las Infecciones nosocomiales	3
2.2 La farmacorresistencia en bacterias	6
2.3 Causas de la farmacorresistencia en México	7
2.4 Bacterias farmacorresistentes en México	8
2.5 Microorganismos ESKAPE	9
2.6 Importancia clínica de los microorganismos ESKAPE	10
2.6.1 <i>Enterococcus faecium</i>	10
2.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.6.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
2.6.4 <i>Acinetobacter baumannii</i>	11

2.6.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.6.6	<i>Enterobacter spp</i>	13
2.7	Microorganismos ESKAPE en México	13
2.8	Extractos de plantas como inhibidores de microorganismos	14
3.	JUSTIFICACIÓN	17
4.	HIPÓTESIS	18
5.	OBJETIVO EL TRABAJO	19
5.1	Objetivo general	19
5.2	Objetivos particulares	19
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1	Material vegetal	20
6.2	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	20
6.3	Obtención de los extractos crudos	21
6.4	Rendimiento obtenido de los extractos preliminares	21
6.5	Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana	22
6.6	Determinación de la concentración de los extractos crudos	22
6.7	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)/Concentración Mínima Bactericida (CMB)	23
6.8	Determinación del efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de microorganismos del grupo ESKAPE	23
6.9	Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	24
6.10	Pruebas químicas realizadas a los extractos crudos	25
6.11	Aislamiento de fitoquímicos bioactivos	25
6.11.1	Extracción en reflujo tipo soxhlet	25
6.11.2	Bioautografía	26
6.11.3	Cromatografía en columna	26
6.11.4	Cromatografía en capa fina preparativa	27
6.11.5	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	28

6.12 Pruebas químicas y comparaciones contra estándares realizadas a la banda activa	28
6.13 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la banda activa en <i>S.aureus</i>, <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>	29
6.14 Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de <i>S.aureus</i>, <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>	29
6.15 Análisis Estadístico	29

7. RESULTADOS

7.1 Obtención y rendimiento de los extractos	30
7.2 Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana	30
7.3 Determinación de la concentración de los extractos crudos	31
7.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	32
7.5 Determinación del efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de microorganismos del grupo ESKAPE	34
7.6 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i> para los extractos crudos	39
7.7 Pruebas químicas realizadas a los extractos crudos	40
7.8 Aislamiento de fitoquímicos bioactivos	41
7.8.1 Extracción en reflujo tipo soxhlet	41
7.8.2 Bioautografía	42
7.8.3 Cromatografía en columna	43
7.8.4 Cromatografía en capa fina preparativa	48
7.8.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	49
7.9 Pruebas químicas y comparaciones contra estándares realizadas a la banda activa	51
7.10 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la banda activa en <i>S.aureus</i>, <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>	53
7.11 Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de <i>S.aureus</i>, <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>	54

8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	69
10. PERSPECTIVAS	70
11. BIBLIOGRAFÍA	71
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas utilizadas en el transcurso de esta investigación	20
Tabla 2. Rendimientos obtenidos de los extractos metanólicos preliminares de las plantas en estudio	30
Tabla 3. Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de las plantas en estudio	31
Tabla 4. Concentración de los extractos crudos de las plantas seleccionadas	31
Tabla 5. Toxicidad de los extractos crudos de <i>Atriplex canescens</i> y <i>Prosopis laevigata</i> sobre <i>Artemia salina</i>	40
Tabla 6. Tamizaje fitoquímico de los extractos crudos de las plantas de mayor actividad biológica	41
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de <i>A. canescens</i> sobre <i>S. aureus</i>	44
Tabla 8. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante la columna cromatográfica de <i>P. laevigata</i>	46
Tabla 9. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de <i>S.aureus</i>	54
Tabla 10. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de <i>A. baumannii</i>	55
Tabla 11. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de <i>P. aeruginosa</i>	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. CMI para los extractos de las plantas sobre los microorganismos en estudio	32
Figura 2. CMB para los extractos sobre los microorganismos en estudio	33
Figura 3. Determinación de la CMI y la CMB para los extractos con actividad	33
Figura 4. Resultados de siembra por goteo (Miles y Misra) de los extractos activos	34
Figura 5. Efecto de concentraciones subletales de A) <i>A. canescens</i> y B) <i>P. laevigata</i> sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i>	35
Figura 6. Efecto de concentraciones subletales de A) <i>A. canescens</i> y B) <i>P. laevigata</i> sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i>	36
Figura 7. Efecto de concentraciones subletales de A) <i>A. canescens</i> y B) <i>P. laevigata</i> sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	37
Figura 8. Crecimiento de <i>Acinetobacter baumannii</i> (A), <i>Staphylococcus aureus</i> (B) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (C) en diferentes concentraciones de Metanol (blanco)	38
Figura 9. Efecto de la concentración subletal sobre el crecimiento <i>A. baumannii</i> (microdilución)	39
Figura 10. Actividad antimicrobiana de los extractos (Soxhlet); a) Metanólico, b) Clorofórmico y c) Hexánico	42
Figura 11. Bioautografía del extracto metanólico de <i>A. canescens</i> (Soxhlet) sobre <i>S. aureus</i> , a) Visible y b) UV	43
Figura 12. Bioautografía del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> (Soxhlet) sobre <i>S. aureus</i> , a) Visible y b) UV	43
Figura 13. Polaridad, orden de elución y tipo de compuestos en una separación por cromatografía en capa fina	44
Figura 14. Fraccionamiento del extracto de <i>A. canescens</i> por cromatografía en columna eluída con un gradiente cloroformo:metanol a) UV y b) Cloruro de cobalto. Carril 1 = Gradiente 9.5:0.5. Carril 2 = 9:1. Carril 3 = 8.5:1.5. Carril 4 = 8:2. Carril 5 = 7.5:2.5. Carril 6 = 6:4. Carril 7 5.5:4.5	44
Figura 15. Elución de la columna cromatográfica de <i>P. laevigata</i>	45

Figura 16. Fraccionamiento del extracto de <i>P. laevigata</i> por cromatografía en columna eluída con un gradiente cloroformo:metanol. Carril 1 = 10:0. Carril 2 = 9.5:0.5. Carril 3 = 9:1. Carril 4 = 8.5:1.5. Carril 5 = 8:2	45
Figura 17. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante la columna cromatográfica de <i>P. laevigata</i> sobre <i>S. aureus</i>	47
Figura 18. a) Fracciones activas de <i>A. canescens</i> y b) bioautografía de la unión de ambas fracciones	48
Figura 19. Cromatografía en capa preparativa de la fracción activa eluídas con Benceno: Acetona 7:3 de <i>A. canescens</i> a) UV; y b) bioautografía positiva	48
Figura 20. Cromatograma de HPLC de la banda activa de <i>A. canescens</i> en el canal A ($\lambda= 280$ nm)	50
Figura 21. Cromatograma de HPLC de la banda activa de <i>A. canescens</i> en el canal B ($\lambda= 220$ nm)	51
Figura 22. Cromatografía en capa fina de <i>A. canescens</i> . Cariles 1: extracto crudo. Carril 2: banda activa. Carril 3: Gradiente de la columna 9:1. Carril 4. Gradiente de la columna 8.5:1.5	52

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

IN	Infección Nosocomial
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidad formadora de colonia
TLC	Thin layer chromatography (Cromatografía en capa fina)
Rf	Factor de retención
λ	Longitud de onda
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
MH	Mueller Hinton
F ₂₅₄	Indicador de Fluoresceína
UV	Ultravioleta
mAU	miliunidades de absorbancia
PLC	Preparative thin-layer chromatography (Cromatografía en capa fina preparativa)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)

RESUMEN

Los microorganismos nosocomiales ESKAPE han sido reconocidos por su importancia hospitalaria, debido a la resistencia que en la actualidad presentan contra los antibióticos. En años recientes se han buscado alternativas novedosas que coadyuven en el tratamiento de este tipo de patógenos, dentro de las que destacan los extractos de plantas o sus principios activos, los cuales pueden presentar propiedades antimicrobianas sin ocasionar aumento de la resistencia antes mencionada. Por lo anterior, en el presente trabajo se procedió a evaluar las propiedades antimicrobianas de 6 plantas con diferentes extractos y/o sus principios activos, contra microorganismos farmacorresistentes del grupo ESKAPE, para lo cual se realizaron extractos metanólicos, a los cuales se les evaluó su actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión del pozo en agar, seleccionando dos plantas; *A. canescens* y *P. laevigata*, posteriormente se les determinó la CMI/CMB, utilizando un método de microdilución obteniendo CMB's de 4.6 a 12.7 mg/ml para *A. canescens* y de 0.17 a 9.2 mg/ml para *P. laevigata*, de acuerdo a la cepa probada. El aislamiento y purificación de los principios activos se realizó mediante cromatografía en columna y cromatografía en capa preparativa, utilizando como fase móvil diferentes proporciones de cloroformo y metanol, la identificación de los compuestos de interés fue realizada mediante HPLC. Después de la separación de compuestos se obtuvo una fracción alcaloidea con actividad antimicrobiana de *P. laevigata*, y un compuesto puro de *A. canescens*, el cual fue identificado como una cumarina. Adicionalmente se determinó la toxicidad de los extractos, mediante el ensayo de *A. salina* encontrando que el extracto de *A. canescens* resultó ser ligeramente tóxico y el de *P. laevigata* moderadamente tóxico. Por último se evaluó la resistencia de los microorganismos ESKAPE utilizados en este estudio con el Kit de Multidiscos Gram positivos y Gram negativos BioRad, encontrando resistencia de hasta 18 de los 19 antibióticos probados, dependiendo de la cepa. Los resultados obtenidos durante esta investigación sugieren que al menos 2 de las 6 plantas utilizadas, son una fuente de compuestos bioactivos los cuales pueden considerarse como alternativas para el control de microorganismos nosocomiales del tipo ESKAPE.

ABSTRACT

ESKAPE nosocomial microorganisms have been recognized due to the resistance that currently presented against antibiotics. Nowadays researches have been looking for new alternatives that can help in the treatment against diseases caused by that kind of microorganisms, one of these alternatives are the plant extracts and their active compounds, which present antimicrobial activity without increase the resistance. This research evaluates the antimicrobial activity of six different plants and two isolated compounds, against multidrug resistance ESKAPE microorganisms, for this reason methanolic extracts were obtained, which were evaluated for the antimicrobial activity, using diffusion agar methodology, after that, the two better plants, with antimicrobial activity were selected (*A. canescens* and *P. laevigata*). MIC/MBC were determined, using a microdilution method obtained MBC's from 4.6 to 12.7 mg/ml for *A. canescens* and from 0.17 to 9.2 mg/ml for *P. laevigata*, according to the strain tested. Isolation and purification of the active compounds was carried out by column chromatography and preparative layer chromatography using different mixtures of chloroform and methanol as mobile phase, identification of target compounds was carried out by HPLC. After separation procedure one alkaloid fraction with antimicrobial activity were obtained from *P. laevigata*, and from *A. canescens* one pure compound, which was identified as a coumarin. Additionally, the toxicity of the extracts was determined by *A. saline* test, in this case the results indicated that *A. canescens* extract is slightly toxic and *P. laevigata* extract is moderately toxic. Finally resistance of ESKAPE microorganisms used in this study was evaluated, using Multidisc BioRad Gram positive and Gram negative Kit, finding resistance to 18 from 19 antibiotics tested according strain tested. The results of this investigation demonstrate that at least two plants from the six tested, provides bioactive compounds that can be considered as alternatives for the control of the ESKAPE nosocomial microorganism.

1. INTRODUCCIÓN

Una infección nosocomial (IN) es: aquella que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud, en quien la infección, no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento de su ingreso al establecimiento de salud. Comprende las infecciones contraídas por una persona, durante su estancia en un hospital, que se pueden manifestar durante el periodo de internamiento o después del alta hospitalaria, además se incluyen las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento. Dichas infecciones están entre las principales causas de defunción y aumento de la morbilidad en pacientes hospitalizados; siendo la máxima prevalencia de estas, en las unidades de cuidados intensivos, en pabellones quirúrgicos y ortopédicos de atención de enfermedades agudas. Las tasas de prevalencia de este tipo de infecciones son mayores en pacientes de edad avanzada, con alguna enfermedad subyacente o en pacientes inmunocomprometidos debido a tratamientos de quimioterapia (Girard *et al.*, 2003).

Algunos factores favorecen las IN en pacientes hospitalizados como: la reducción de la inmunidad; incremento de procedimientos médicos y técnicas invasivas las cuales crean posibles vías de infección; y la transmisión de bacterias farmacorresistentes en poblaciones hacinadas en los hospitales, donde las prácticas deficientes de control de infecciones pueden facilitar su transmisión. Este último factor, se contribuye fuertemente debido que a muchos pacientes hospitalizados les son prescritos antibióticos como parte de su terapia, lo que promueve el surgimiento de cepas de bacterias polifarmacorresistentes, ya que se reduce la proliferación de microorganismos de la flora humana normal los cuales son sensibles al antibiótico administrado, pero las cepas resistentes persisten y pueden llegar a ser endémicas en el hospital (Girard *et al.*, 2003).

Hoy en día, muchas cepas de neumococos, estafilococos, enterococos y bacilos de la tuberculosis son resistentes a la mayor parte o la totalidad de los antimicrobianos que alguna vez fueron eficaces para combatirlos (Girard *et al.*, 2003). Dentro de este

grupo de microorganismos polifarmacoresistentes causantes de IN, se tiene especial interés en los pertenecientes al grupo ESKAPE, nombre recibido por los microorganismos que lo conforman (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) estas bacterias son extraordinariamente importantes, no sólo porque causan la mayor parte de las infecciones nosocomiales sino también porque representan paradigmas de la patogénesis, transmisión y resistencia; debido a la prevalencia de los factores antes mencionados: ambientes hospitalarios, deficientes métodos de intervención, terapias inefectivas y el uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos. Por tal motivo si aprendemos a controlar estos microorganismos, nuestros hospitales serán inconmensurablemente más seguros (Rice, 2008). A menudo la resistencia antimicrobiana se encuentra también asociada a la infección y por tanto también vinculada a virulencia. En ambientes con una fuerte presión antimicrobiana, es relativamente fácil para las bacterias desarrollar mutaciones cromosómicas, así como también dichos microorganismos pueden adquirir y distribuir plásmidos portadores de genes de resistencia, con los cuales se modifican algunos factores de virulencia (Beceiro *et al.*, 2012).

Debido a la presencia e incremento de microorganismos multiresistentes, existe una necesidad apremiante de desarrollar agentes antimicrobianos nuevos e innovadores. Como una alternativa de nuevos agentes, se encuentran las plantas, debido a que contienen una gran variedad de compuestos bioactivos que pueden ser de interés en la terapéutica. Además hay una larga tradición de uso de plantas en el tratamiento de enfermedades infecciosas en la medicina popular (Chowdhury *et al.*, 2013). Abriendo así, un campo de investigación sobre la prevención y tratamiento de las enfermedades nosocomiales; ya que los principios activos naturales aislados de plantas, pueden inhibir el crecimiento de dichas bacterias, esto sin generar una presión selectiva como ya lo hacen los antibióticos. Por lo antes mencionado se considera que los compuestos naturales no generarán resistencia, y se dispondrá de alternativas no solo a infecciones nosocomiales; si no también en contra de cualquier tipo de bacteria (Upadhyay *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema de salud e impacto de las Infecciones nosocomiales

Los sistemas de salud se financian con recursos públicos, privados y aquellos provenientes del exterior, como las donaciones. Los recursos públicos en México proceden principalmente de los impuestos y otros ingresos gubernamentales no tributarios. El gasto privado, por su parte, lo financian las familias con recursos propios, las organizaciones no gubernamentales (ONG) y las empresas privadas. México destaca entre los países que menos gasta en salud pública por habitante según la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y el Banco Mundial. Aunque su gasto en este rubro aumenta año tras año, en las prioridades de los diputados para 2009, hubo partidas estratégicas ajustadas, como las de mantenimiento de infraestructura, vigilancia epidemiológica, reducción de enfermedades prevenibles por vacunación, e investigación y desarrollo tecnológico en salud, siendo el subejercicio presupuestal uno de los principales problemas (Arreguín *et al.*, 2012).

A pesar de esto, durante las últimas décadas México ha generado y recibido los beneficios de una mejoría notable en las condiciones de salud. El mejor reflejo de ello se observa en la esperanza de vida al nacimiento: en la segunda mitad del siglo XX este indicador tuvo un incremento de 27 años, de 48 años en 1950 a 75 en 2005. Las principales causas de muerte también se han modificado. Las infecciones y los problemas que tienen vínculos con la desnutrición y la reproducción han sido desplazados por las enfermedades no transmisibles y las lesiones, que hoy concentran más de 85% de las causas de muerte en el país. Si bien estos avances han sido, en buena medida, producto de una mejoría en las condiciones generales de vida, no podrían explicarse cabalmente sin tomar en cuenta el consistente esfuerzo de las instituciones de salud en México. Casi todos los países del mundo, alrededor de tres cuartas partes del financiamiento del sector salud se destina a la prestación de servicios de atención médica vía la operación de una red de hospitales, clínicas y centros de salud. Elevar la calidad y la eficiencia en la prestación de estos servicios es una condición necesaria para

garantizar que cada peso invertido genere los mayores beneficios posibles en la salud de la población. Las infecciones nosocomiales (IN) son un problema relevante de salud pública, de importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad (Arreguín *et al.*, 2012).

Los problemas asociados a las IN son diversos y rebasan el ámbito clínico (descritos más adelante). Uno de esos se refiere a la carga económica que origina su atención que afecta a los pacientes y sistemas de salud. Desafortunadamente, existen pocos datos en la literatura sobre la repercusión de la IN en los sistemas de salud en los países en vías de desarrollo. La medición del gasto en salud es complicada porque la información es escasa, incompleta y muchas veces de calidad cuestionable. Las tasas de IN en países desarrollados son relativamente bajas, afectando del 5 al 10 % de los pacientes hospitalizados. Sin embargo, tomando en cuenta que cada año son hospitalizados 35 millones de pacientes tan solo en Estados Unidos, el número estimado de pacientes que adquieren una infección hospitalaria sería de 1.75 a 3.5 millones de casos. Cada caso se relaciona además con un incremento de 4.3 a 15.6 d de estancia intrahospitalaria, así como un aumento en el costo del tratamiento que va de los 1,909 a 38,656 USD según datos reportados (Chen *et al.*, 2005). Lo anterior significaría cerca de 8 millones de días/cama utilizados en IN y un costo de cuatro millones de dólares. A nivel de la región de América Latina, existen algunos reportes sobre los costos estimados asociados a infección nosocomial con variaciones entre los diversos países e instituciones. En México se ha reportado que el costo promedio por episodio de IN es de US\$8,990. Otros estudios en México han estimado que el costo promedio de atención de un caso de IN es de aproximadamente US \$ 4,200. En 2009, a través de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, se registraron 37,258 casos de IN. Esto implicaría que se gastaron alrededor de 160 millones de dólares en ese año. Esta cifra representa casi un 2% del presupuesto total asignado a la Secretaría de Salud para el año 2012 y un 96% del rubro asignado para gastos de operación en unidades médicas (Arreguín *et al.*, 2012).

Lo anterior nos indica que, para cubrir los gastos generados ante un caso de IN, los hospitales en México se ven obligados la mayoría de las veces a utilizar recursos que han sido asignados para otros fines. Además, podemos inferir que el mayor porcentaje del gasto, es solventado por las instituciones de seguridad social y por los pacientes principalmente en la adquisición de tratamientos (ej. antibióticos), consulta de especialistas, estudios y procedimientos. Las IN afectan gravemente la economía familiar en países en vías de desarrollo, en el 2009 de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el gasto del gobierno en salud per cápita en México fue de US \$ 253 el cual es menor que algunos países de Latinoamérica como Brasil y se encuentra muy por debajo de países desarrollados como Estados Unidos (Arreguín *et al.*, 2012).

Las IN, agravan la discapacidad funcional y la tensión emocional del paciente y pueden ocasionar trastornos discapacitantes que reducen la calidad de vida. Estas son una de las principales causas de defunción. La edad avanzada, incremento en enfermedades crónicas, el mayor uso de procedimientos terapéuticos y de diagnóstico, afectan las defensas de los pacientes internados en establecimientos de atención de salud, y constituirán una presión constante en las infecciones nosocomiales en el futuro. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales pueden ser transmitidos a la comunidad por los pacientes después del alta hospitalaria, el personal de atención de salud y los visitantes. Si dichos microorganismos son multirresistentes, pueden causar enfermedad grave en la comunidad (Girard *et al.*, 2003).

El paciente está expuesto a una variedad de microorganismos durante la hospitalización. El contacto entre el paciente y un microorganismo, en sí, no produce necesariamente una enfermedad clínica, influyen muchos factores en la naturaleza y frecuencia de las infecciones nosocomiales. La posibilidad de exposición conducente a infección depende, en parte, de las características de los microorganismos, resistencia a los antimicrobianos, la virulencia intrínseca y la cantidad de material infeccioso (inóculo). Antes de la introducción de las prácticas básicas de higiene y de los antibióticos al ejercicio de la medicina, las infecciones nosocomiales, en su mayoría, se debían a agentes patógenos de origen externo (enfermedades transmitidas por alimentos,

aire, gangrena gaseosa, tétanos, etc.) o eran causadas por microorganismos externos a la flora normal de los pacientes (por ejemplo, difteria, tuberculosis). El progreso alcanzado en el tratamiento de las infecciones bacterianas con antibióticos ha reducido considerablemente la mortalidad por muchas enfermedades infecciosas. Hoy en día, casi todas las infecciones nosocomiales son causadas por microorganismos comunes en la población en general, que es inmunodeficiente o que sufre una enfermedad más débil que la causada a los pacientes hospitalizados (*Staphylococcus aureus*, estafilococos negativos a la coagulasa, enterococos y *Enterobacteriaceae*). El uso generalizado de antimicrobianos para tratamiento o profilaxis (incluso de aplicación tópica) es el principal factor determinante de resistencia. Con el incremento en el uso de un agente antimicrobiano, a la larga surgirán bacterias resistentes a ese producto, que pueden propagarse en el establecimiento de atención de salud. Actualmente, muchas cepas de neumococos, estafilococos, enterococos y bacilos de la tuberculosis son resistentes a la mayor parte o la totalidad de los antimicrobianos que alguna vez fueron eficaces para combatirlos. Como ejemplo podemos citar a *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa* polifarmacorresistentes que son prevalentes en hospitales. Este problema es de mayor importancia crítica particular en los países en desarrollo, donde quizá no se dispone de antibióticos de segunda generación o su precio es inasequible (Girard *et al.*, 2003).

2.2 La farmacorresistencia en bacterias

La farmacorresistencia es un fenómeno evolutivo natural, cuando una población bacteriana se expone a cierto antibiótico, los microorganismos sensibles mueren y los resistentes sobreviven, propagando la resistencia a su descendencia. Este fenómeno se ve favorecido por el uso inadecuado de los antibióticos, que puede ser excesivo, insuficiente o inapropiado; hay datos que estiman que del 25 al 40% de los pacientes hospitalizados reciben terapias con antibióticos y que un 10 a 50% los reciben de forma inadecuada (Camacho, 2013).

Las definiciones de resistencia se clasifican de acuerdo al número y a la clase de antibióticos involucrados. La multirresistencia (Multiple Drug Resistance, MDR) se define como la ausencia de sensibilidad a por lo menos, un fármaco en tres o más clases de antibióticos; la resistencia extrema (Extensively Drug-Resistant, XDR) se refiere a la ausencia de sensibilidad, por lo menos, a un agente en todas clases de antimicrobianos excepto en dos de ellas o menos, y la resistencia a todos los antimicrobianos (Pandrug-resistant, PDR) se define como resistencia a todas las clases de antibióticos. Las listas de clases de antimicrobianos propuestos para las pruebas de sensibilidad fueron creados usando documentos del Instituto Clínico Normas de Laboratorio (CLSI), el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA). (Magiorakos *et al.*, 2012).

Muchos factores que contribuyen a la aparición de bacterias resistentes son la falta de acceso a los medicamentos o la baja calidad de los mismos, ya que los pacientes pueden quedar expuestos a bajas concentraciones del fármaco, además existen reportes de que el uso de antimicrobianos en dosis subóptimas en ganadería y avicultura, puede generar bacterias multirresistentes, y estas pueden ser transmitidas al humano (Camacho, 2013).

Algunos de los medicamentos que posiblemente promueven la propagación de genes de resistencia, como las quinolonas o tetraciclinas, se utilizan con más frecuencia en América Latina, por lo tanto, dicha propagación es más que una simple presión selectiva, sino que se considera la causa directa más probable del aumento de la resistencia en países latinoamericanos (Beaber *et al.*, 2003).

2.3 Causas de la farmacorresistencia en México

El uso inadecuado y abuso de los antibióticos se considera la causa más importante del aumento de la resistencia. Tal vez el primer problema que tenemos en México es la falta de información acerca de la cantidad de antibióticos utilizados tanto para fines clínicos y no clínicos. Una revisión reciente publicada en la revista del

Instituto Nacional de Salud Pública de México mencionaba que las prácticas de prescripción y el uso de antibióticos, son obsoletas ya que tienen de 10 a 20 años de uso (Dreser, 2008). También comúnmente se presume que la mayoría de los médicos prescriben antibióticos inadecuadamente en aproximadamente la mitad de los casos (Kumarasamy *et al.*, 2003). Por otro lado se ha encontrado que los medicamentos genéricos contienen concentraciones de antibióticos significativamente menores que la contraparte original (Jones *et al.*, 2008; Amábile, 2010). Por lo tanto se considera que las drogas menos potentes, no mantienen las concentraciones inhibitorias en la sangre y los tejidos durante el tiempo requerido, por tal motivo pueden generar resistencia.

La automedicación es otro problema debido a el uso irracional de éstos, puede generar resistencia bacteriana, reflejado en ineficacia terapéutica. (Amábile, 1998 & Gómez *et al.*, 2009).

2.4 Bacterias farmacorresistentes en México

Rodríguez *et al.*, (2014) realizaron un estudio de farmacorresistencia bacteriana en microorganismos aislados de hemocultivos de pacientes con septicemia, dicho estudio se llevó a cabo durante el período 2009 al 2011. El análisis de 137 hemocultivos mostró que las cepas bacterianas con mayor prevalencia de resistencia son: *Staphylococcus hominis*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. En años recientes se han detectado cepas resistentes de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus cohnii* en países de primer mundo y en México *Enterococcus faecalis*. Se han reportado casos aislados de resistencia intermedia en *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis* contra linezolid; Por lo antes mencionado se debe considerar que la práctica clínica, las políticas de regulación farmacéutica y las industrias farmacéuticas colaboren en el uso adecuado de este tipo de fármacos para prolongar su efectividad media sobre las bacterias correspondientes.

2.5 Microorganismos ESKAPE

Las infecciones nosocomiales han sido reconocidas como un importante problema de seguridad de los pacientes hospitalizados. La manifestación y propagación de la resistencia a los antimicrobianos y la falta de investigación de agentes antimicrobianos con actividad frente a patógenos resistentes a múltiples fármacos han incrementado la preocupación de que estas infecciones pueden en un futuro cercano llegar a ser inmanejables, debido a la falta de tratamiento antibacteriano eficaz. La mayoría de los problemas de resistencia en los hospitales modernos se concentran en un número limitado de especies bacterianas, que se han agrupado bajo el acrónimo de los patógenos "ESKAPE" (Rice, 2010). Se acuñó dicho término a este grupo de microorganismo en el año 2008 por Rice, para hacer referencia a un conjunto de bacterias con poder patógeno y que además en el transcurso del tiempo han logrado adquirir una gran variedad de mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos que le permiten en la actualidad evadir prácticamente la mayoría de opciones terapéuticas disponibles. Bajo esta nomenclatura se agrupa al **E**: *Enterococcus faecium* resistente a glicopéptidos, **S**: *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina, **K**: *Klebsiella pneumoniae* productora de B-lactamasas de espectro expandido, **A**: *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemos, **P**: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemos, **E**: *Enterobacter* spp., resistentes a cefalosporinas de 3ra generación. Así mismo, los datos más recientes disponibles de la Red Nacional de Seguridad Sanitaria indican que los patógenos ESKAPE están involucrados aproximadamente en el 40 % de las infecciones de pacientes en las unidades de cuidados intensivos. Las tasas de resistencia son fundamentales en estos patógenos, que van desde la resistencia que prácticamente excluye completamente un antibiótico de la consideración terapéutica empírica (tratamiento en el que básicamente se usan antibióticos basados en los síntomas del paciente, donde el médico no espera la identificación de las bacterias causantes de la infección), a la resistencia que indica el potencial de alterar las opciones tanto de la terapia empírica y definitiva a los antimicrobianos (Rice, 2010).

2.6 Importancia clínica de los microorganismos ESKAPE

2.6.1 *Enterococcus faecium*

Los enterococos son cocos Gram-positivos, no forman espora y son anaerobios facultativos; forman parte de la microbiota intestinal normal y causan infecciones oportunistas (Sava *et al.*, 2010; Bhardwaj *et al.*, 2013). De los enterococos, específicamente *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, son la tercera causa más común de infección nosocomial (Paganelli *et al.*, 2013); causando infecciones de las vías urinarias, endocarditis, bacteriemia, abscesos intra-abdominales e intra-pélvicos (Bhardwaj *et al.*, 2013); la mayoría de las infecciones en pacientes hospitalizados están asociados con el uso de dispositivos médicos permanentes, tales como: la canalización venosa (central) y catéteres urinarios. Un paso crítico en la patogénesis de estas infecciones es la colonización de estas superficies por enterococos y la formación de biopelículas con múltiples capas, ya que esto implica un proceso complejo, de unión de las células individuales para el desarrollo de una comunidad bacteriana en tres dimensiones, rodeado por una matriz extracelular que esta constituida por: polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (eDNA). La matriz es un componente que juega un papel importante en la estabilidad de biopelículas para la protección contra los agentes antimicrobianos y las células inmunes; otorgando así patogenicidad a *E. faecium* (Paganelli *et al.*, 2013). El tratamiento contra *Enterococcus faecium* se basa en el efecto sinérgico de la penicilina/ampicilina o vancomicina/aminoglucósido, sin embargo ha desarrollado una marcada resistencia, convirtiéndolo en un problema hospitalario (Bhardwaj *et al.*, 2013).

2.6.2 *Staphylococcus aureus*

Es un coco Gram-positivo que es parte de la flora normal transitoria de piel y mucosas. Esta bacteria, se encuentra colonizando aproximadamente un 20% de los pacientes hospitalizados y un 16% del personal hospitalario; además de ser capaz de sobrevivir por 12 d en superficies inanimadas. Por lo antes mencionado este

micoorganismo es importante como patógeno nosocomial; *S. aureus* puede ser resistente a los antibióticos beta lactámicos no solamente por la producción de betalactamasas, sino a cambios estructurales en el sitio de unión del fármaco, evitando de esta manera la acción antibiótica, como es el caso de la resistencia a la oxacilina, denominándose en la actualidad como *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR). Posteriormente surgieron nuevas drogas antimicrobianas como la vancomicina y la teicoplanina, puntualizando en el 1997 resistencia intermedia a vancomicina y para el 2000, alto nivel de resistencia a éste antibiótico. La situación hoy en día representa un problema de salud pública, tanto por el aumento del costo del tratamiento como por las complicaciones infecciosas (Hernández *et al.*, 2010).

2.6.3 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es una bacteria de forma bacilar, Gram-negativa, anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos. En el hombre coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Es importante señalar que la tasa de colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, en forma directamente proporcional a la duración de la estancia y especialmente a la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre la flora del huésped (Echeverri y Cataño, 2010). *K. pneumoniae* es responsable de infecciones nosocomiales del tracto urinario, septicemia, neumonía e infecciones intra-abdominales. A mediados de la década de 1980, un síndrome clínico distinto de abscesos hepáticos e infecciones metastásicas fue causado por este microorganismo; también puede causar neumonía grave, bacteriemia y meningitis (Decré *et al.*, 2011).

2.6.4 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii es un bacilo Gram-negativo no fermentador, oxidasa negativo y catalasa positiva (Díaz, 2010), puede encontrarse en diversas fuentes tales como: suelo, vegetales, carne y pescado. *A. baumannii* puede ocasionalmente colonizar

la piel del ser humano sano. La colonización de otros sitios del cuerpo, tales como: garganta, fosas nasales, y tracto intestinal, se observó escasamente en individuos sanos (Vahdani *et al.*, 2011). *A. baumannii* sobrevive en objetos animados e inanimados; en el medio hospitalario se ha aislado de: humidificadores, ventiladores, piel del personal de salud, colchones, cojines y otros equipos. Se ha reportado una sobrevivencia en superficies secas mayor a 25 d, por lo tanto se relaciona con brotes nosocomiales (Díaz, 2010). *A. baumannii* es considerada actualmente como una de las bacterias Gram-negativas más importantes que causan infecciones en pacientes hospitalizados inmunocomprometidos, principalmente en las unidades de cuidados intensivos (Japoni *et al.*, 2013). Otra de sus características es la resistencia a múltiples antibióticos, por ejemplo, a todos los betalactámicos (incluyendo carbapenemos), debido a que utiliza diferentes mecanismos dentro de los cuales encontramos: betalactamasas de espectro extendido (BLEE), metalo-beta-lactamasas, alteraciones de las proteínas ligadoras de penicilina, disminución de la permeabilidad de la membrana externa, mutación de los sitios blanco e inactivación de los sitios por enzimas modificantes (Díaz, 2010).

2.6.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo no fermentador de la glucosa; está muy extendido en entornos naturales y con frecuencia se encuentra como parte de la microflora humana en individuos sanos, sin embargo llega a ser patógeno oportunista. En los últimos años, se ha reconocido como enfermedad aguda, y un problema en los hospitales debido a su resistencia intrínseca a muchas clases de antibióticos (Fazeli *et al.*, 2012). Principalmente es causante de infecciones intrahospitalarias y concretamente de infecciones adquiridas en las unidades de cuidados intensivos (UCI), entre las que destaca la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM). Otro grupo de pacientes que son infectados frecuentemente por *P. aeruginosa* son aquellos con enfermedades crónicas pulmonares tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias o de fibrosis quística, la presencia de lesiones o alteraciones en la superficie del epitelio respiratorio secundarias a la intubación traqueal, ventilación mecánica, traumatismos por la aspiración de secreciones o patología crónica

pulmonar y en menor frecuencia también es causante de infecciones en pacientes neutropénicos, con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y en pacientes con quemaduras (Vallés y Mariscalb, 2005).

2.6.6 *Enterobacter spp.*

Enterobacter spp. es un microorganismo Gram-negativo, de los cuales varias cepas son patógenos oportunistas en los nosocomios. Se encuentran sobre la piel humana, plantas, suelos, agua, cloacas, los tractos intestinales y en algunos productos lácteos (Grimont & Grimont, 2006). *Enterobacter spp.* no se consideró una de las causas de las infecciones nosocomiales hasta 1970. Sin embargo en las últimas décadas, las bacteriemias nosocomiales por *Enterobacter* se han reportado con mayor frecuencia, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos. Además de eso, especies del género *Enterobacter* muestran aumento de la resistencia a los antimicrobianos. La tasa de bacteriemia por *Enterobacter* es alrededor de 1 por 1,000 ingresos a los hospitales universitarios y instituciones de atención terciaria (Boban, 2011).

2.7 Microorganismos ESKAPE en México

En México la investigación sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos, se inicia con infecciones gastrointestinales, también hay reportes y descripción de mecanismos de resistencia de microorganismos patógenos que principalmente se aíslan de infecciones intrahospitalarias. En nuestro país se tiene un panorama general de la resistencia a infecciones comunitarias más frecuentes, como las de vías respiratorias (Rodríguez *et al.*, 2014).

Hace tres décadas, *A. baumannii* era sensible a la mayoría de los antibióticos comunes, pero hoy en día es excepcionalmente resistente a ellos, con la resistencia a carbapenemos mayor del 50% en algunos países. Recientemente, datos obtenidos en Monterrey, México, informaron una resistencia a meropenem (MEM) del 69%. Un factor importante que contribuye a la resistencia hacia los antibióticos es la producción

de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por *K. pneumoniae*. La difusión de patógenos Gram-negativos productores de BLEE en los hospitales es un problema global emergente que merece una consideración especial. En el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Nuevo León, México de un total de 1,692 aislamientos clínicos, que incluían muestras respiratorias, sangre, orina, catéter y otros sitios, los patógenos ESKAPE fueron identificados en el 64,5% (1092/1692) de los aislados. En general, los microorganismos aislados con mayor frecuencia fueron: *Acinetobacter baumannii* (15,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (14,3%), *Staphylococcus aureus* (14,2%) y *Klebsiella pneumoniae* (11,3%) y con menor frecuencia del género *Enterococcus*, *E. faecalis* (7,2%), *E. faecium* (2,1%) y del género *Enterobacter*, *E. cloacae* (4,1%) y *E. aerogenes* (1,7%) (Llaca *et al.*, 2013).

Debido a la importancia de este grupo de microorganismos como causantes de infecciones nosocomiales se decidió trabajar con los tres microorganismos que de mayor incidencia en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Nuevo León, México en el periodo Junio de 2011 hasta Junio de 2012 (Llaca *et al.*, 2013).

2.8 Extractos de plantas como inhibidores de microorganismos

Las bacterias patógenas siempre se han considerado como una causa importante de morbilidad y mortalidad en los seres humanos. A pesar de que las compañías farmacéuticas han producido una serie de nuevos antibacterianos en los últimos años, la resistencia a estos fármacos ha aumentado y ahora se ha convertido en una preocupación mundial (Djeussi *et al.*, 2013).

Las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, tales como cumarinas, taninos, alcaloides, y flavonoides, los cuales presentan propiedades antimicrobianas *in vitro*. A pesar de la abundante literatura sobre las propiedades antimicrobianas de extractos, muy pocos de los productos químicos obtenidos que han tenido éxito, han sido explotados para uso clínico como antibióticos (Sibanda & Okoh, 2007).

Algunos reportes de las plantas utilizadas para este trabajo:

Prosopis laevigata; los extractos metanólicos y acetónicos obtenidos de las hojas y el tronco de esta planta presentaron actividad antimicrobiana contra la cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* y la levadura *Candida albicans* (Salinas *et al.*, 2009).

Sophora secundiflora; no se tiene reportes sobre la actividad antimicrobiana; pero con respecto a este género de planta los extractos de las raíces de *S. flavescens* se han utilizado para las infecciones microbianas y reflejan mucho que los productos naturales son la principal fuente de los agentes antimicrobianos importantes. Algunos flavonoides se han aislado a partir de especies de *Sophora*. La sophoraflavanona aislada de *S. exigua* mostró una fuerte actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (Sato *et al.*, 1995); kurarinona, sophoraflavanona G y kuraridina también mostraron una fuerte actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* (Yamaki *et al.*, 1990). La kuraridina, sophoraflavanona D y sophora isoflavanona A tienen actividad antimicrobiana contra los hongos (*C. albicans* y *S. cerevisiae*), bacterias Gram negativas (*E. coli* y *S. typhimurium*) y bacterias Gram positivas (*S. epidermidis* y *S. aureus*) (Sohn *et al.*, 2004).

Yucca filifera; de esta planta hay escasos reportes sobre la actividad antimicrobiana: en estudios de Ruiz *et al.* en 2011 se describen las propiedades biológicas de los extractos de plantas mexicanas utilizadas en la medicina tradicional. El tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de las plantas *Lippia berlandieri*, *Larrea tridentata*, *Fluorensia cernua*, *Carya illinoensis* y *Yucca filifera* se llevó a cabo usando técnicas cromatográficas revelando la presencia de terpenos, flavonoides, taninos, saponinas y compuestos polifenólicos. Y así mismo evidenciaron un gran potencial para su uso como conservadores, antioxidantes y agentes funcionales; sin embargo, la fitoquímica de estas plantas no está bien documentada.

Gutierrezia microcephala no hay reportes de actividad antimicrobiana; pero Mabry (1986) aisló un gran número de flavonoides de esta planta.

Atriplex canescens; no hay reportes de actividad antimicrobiana, esta planta es consumida por los ovinos y caprinos (Parra *et al.*, 2002). Se le han encontrado características que le confieren un gran valor forrajero, como su alta aceptación por el ganado, buen valor nutricional y fácil acceso al ramoneo (Fierro, 1991). Además, se ha reportado que el contenido de taninos y fenoles es bajo, por lo tanto no constituyen factores limitantes para el consumo por el ganado (Boutouba *et al.*, 1990).

Nothoscordum bivalve hay reportes de actividad antimicrobiana hasta la fecha; y no hay información respecto a su fitoquímica.

Además de utilizar el extracto o parte de este para su evaluación antimicrobiana, es importante determinar el compuesto (s) responsable (s) del efecto deseado. Robles en 2003 evaluó la actividad de los extractos de la familia *Burseraceae*, contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Fusarium oxysporum*; estos extractos fueron fraccionados y purificados por cromatografías en columnas; de estos se aislaron 7 sólidos de los cuales se encuentran en estudio cuatro de ellos y tres se han identificados por sus características espectroscópicas como: ácido 3-oxotirucala-8,24-dien-21-oico (ácido elemonico), ácido 3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-oico (ácido elemolico) y ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico.

Para el aislamiento y purificación de un compuesto químico de interés por su actividad antimicrobiana fue descrito por Jamil *et al.* (2012); integra los procesos de separación de compuestos en una mezcla, utilizando diversos métodos de análisis, con los resultados obtenidos de las pruebas biológicas. El proceso comienza con la prueba de un extracto para confirmar su actividad, seguido de la separación de los compuestos en la matriz y de las fracciones del extracto crudo.

3. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos pertenecientes al grupo ESKAPE, causantes de infecciones nosocomiales son considerados de mayor importancia en el ambiente hospitalario, debido a la resistencia hacia los antibióticos que existen actualmente y se les considera como un posible blanco terapéutico. Es de vital importancia la búsqueda de alternativas para la prevención y tratamiento de las infecciones nosocomiales ocasionadas por microorganismos farmacorresistentes presentes en hospitales. Las plantas son una alternativa ya que producen una gran variedad de moléculas con propiedades medicinales y terapéuticas, que han mostrado ser efectivos al inhibir el crecimiento así como factores de virulencia en algunos microorganismos. Estos compuestos de origen natural, producirán una menor resistencia por los microorganismos que la adquirida por los fármacos sintéticos. En el presente trabajo se buscaron algunos principios activos de plantas que pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos del grupo ESKAPE.

4. HIPÓTESIS

Los diferentes extractos de plantas y/o sus compuestos aislados inhiben el crecimiento *in vitro* de los microorganismos nosocomiales *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* pertenecientes al grupo ESKAPE.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de los extractos de plantas o sus compuestos aislados, al inhibir el crecimiento *in vitro* de tres patógenos asociados a infecciones nosocomiales, del grupo ESKAPE, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2 Objetivos particulares

- 1) Obtener extractos metanólicos para realizar ensayo preliminar de actividad antimicrobiana.
- 2) Obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos que presenten actividad antimicrobiana.
- 3) Determinar las concentraciones subletales de la CMB y evaluar su efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.
- 4) Evaluar la toxicidad de los extractos activos mediante el ensayo de *Artemia salina*.
- 5) Purificar e identificar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos activos por técnicas cromatográficas y espectroscópicas.
- 6) Evaluar la resistencia a diferentes antibióticos en contra de los microorganismos ESKAPE utilizados para este estudio.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio: Salud y enfermedades importantes de la sociedad mexicana.

6.1 Material vegetal

Se colectaron 6 especies de plantas que crecen de forma silvestre; una de ellas en el estado de Aguascalientes (21°54'48.6"N 102°19'02.9"W) y el resto en los alrededores de la comunidad Casablanca, municipio de Santa Catarina, Nuevo León (25°39'11.33"N 100°42'41.09"W con un radio de 1.5 Km a partir este punto). Una parte de los especímenes colectados fueron colocados en una prensa botánica, para después ser depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, para su posterior identificación. (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas utilizadas en el transcurso de esta investigación.

Nombre Común	Nombre Científico	Parte Utilizada	Ubicación
Cenizo	<i>Atriplex canescens</i> (Pursh) Nutt.	Parte Aérea	Nuevo León
Laurel de montaña	<i>Sophora secundiflora</i> (Ortega) DC.	Parte Aérea	Nuevo León
Yuca	<i>Yucca filifera</i> (Chabauud)	Parte Aérea	Nuevo León
Falso ajo	<i>Nothoscordum bivalve</i> (L.) Britton.	Parte Aérea	Nuevo León
Escobilla	<i>Gutierrezia microcephala</i> (DC.) A. Gray	Parte Aérea	Nuevo León
Mezquite	<i>Prosopis laevigata</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C.Johnst.	Hojas	Aguascalientes

6.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* todas ellas aislados nosocomiales del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Nuevo León, México.

Las cepas fueron mantenidas en tubos con Agar Mueller Hinton (MH; Difco) a 4°C. Para la activación de cada una de las cepas se tomó una asada del medio de reserva y se sembró en 5 mL de caldo MH. Los tubos se incubaron durante 16-18 h a 37°C.

Asimismo las cepas utilizadas fueron conservadas en alícuotas de 0.5 mL de caldo MH a -80°C utilizando glicerol como crioprotector.

6.3 Obtención de los extractos crudos

Todas las plantas fueron secadas a temperatura ambiente, trituradas en una licuadora Ostreizer, y almacenadas a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco, hasta su utilización

Para la obtención de los extractos crudos, 100 g de planta seca y triturada se colocaron en frascos de vidrio con tapón de rosca a los cuales se les agregó 300 ml de metanol absoluto (MeOH) véase en Tabla 2. Los extractos alcohólicos se maceraron durante 24 h a temperatura ambiente. Después del periodo de maceración los extractos alcohólicos se filtraron utilizando papel Whatman No. 1. Los filtrados fueron concentrados en un rotavapor (Yamato BM 100) hasta sequedad. Los extractos secos se resuspendieron en no más de 15 mL del solvente utilizado para la extracción primaria (MeOH). Los extractos concentrados fueron almacenados a 4°C en viales ámbar hasta su uso. Durante el periodo de almacenamiento en refrigeración la actividad de los extractos fue evaluado mensualmente (Sánchez *et al.*, 2010).

6.4 Rendimiento obtenido de los extractos preliminares

Para obtener el rendimiento de la extracción, se tomó como referencia el peso del material vegetal antes de la extracción (PI) y el peso del material vegetal seco obtenido después de la extracción (PE), para lo cual se utilizó la fórmula:

$$\text{Rendimiento} = PI - PE$$

De igual manera se utilizó la formula anterior para cada una de las extracciones y fraccionamientos obtenidos a la largo de este trabajo.

6.5 Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana

Para evaluar en forma preliminar el efecto antimicrobiano de los extractos crudos de plantas, sobre el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el método de difusión del pozo en agar (Das *et al.*, 2010). El cual consiste en sembrar por extensión, con la ayuda de un asa de Driglasky, 100 μ l de las cepas previamente activadas, sobre placas Petri con agar Mueller-Hinton. Posteriormente se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo estéril invertido (aprox. 6 mm de diámetro) y posteriormente el agar fue retirado con la ayuda de una espátula estéril. En cada pozo se agregaron 100 μ l de los extractos a evaluar; como blanco se utilizó en uno de los pozos 100 μ l del solvente en el cual fueron resuspendidos los extractos. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. El efecto antimicrobiano del extracto fue evidenciado mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo.

6.6 Determinación de la concentración de los extractos crudos

Para determinar la concentración de los extractos crudos se utilizó la técnica de diferencia en peso, para lo cual, tubos de ensayo limpios fueron colocados en una estufa a no más de 60°C (para eliminar la humedad) los tubos fueron pesados periódicamente hasta que estos presentaron un peso constante, posteriormente se les agregó 1 mL del extracto a evaluar. Lo anterior se realizó por duplicado. De igual manera los tubos con el extracto fueron pesados hasta que presentar un peso constante. Con la diferencia del peso antes y después de agregar el extracto, se determinó la concentración de extracto por mililitro.

6.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)/Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se utilizó el método propuesto por Sánchez *et al.*, (2010) con ligeras modificaciones. En este caso se inocularon 30 mL de caldo MH, con 300 µl (1%) de cada uno de los cultivos previamente activados, como se mencionó en la sección 6.2. Los cultivos fueron homogenizados y posteriormente se tomaron diferentes volúmenes del medio activado los cuales fueron colocados en una microplaca de 96 pozos, mas diferentes concentraciones de los extractos seleccionados, el volumen final de cada pozo fue ajustado a 200 µl. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h, y la CMI fue definida como la concentración en la cual no existe crecimiento visual aparente. Después de registrar la CMI, se tomaron 10 µl de cada pozo donde no se observó crecimiento y se realizó técnica de siembra descrita por Miles y Misra, que consiste en una siembra por goteo sobre el agar MH. Las placas se incubaron de acuerdo a la metodología antes descrita. Pasado el tiempo de incubación se determinó la CMB la cual fue definida como la concentración más baja del extracto que inhiba completamente el crecimiento microbiano.

Cabe mencionar que lo anterior se llevó a cabo de igual manera para el MeOH; los extractos crudos se encontraban resuspendidos en dicho solvente, por lo tanto se determinó el volumen de MeOH que no afectaría el crecimiento de las cepas en estudio.

6.8 Determinación del efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de microorganismos del grupo ESKAPE.

Para esto, se utilizaron concentraciones subletales, correspondientes al 25, 50 y 75 % de la CMB, las cuales fueron previamente determinadas. Al igual que la CMI/CMB se utilizaron microplacas de 96 pozos, a los cuales se les agregaron las concentraciones antes mencionadas, las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C. Para el conteo microbiano se llevó a cabo el Método de microdilución que consiste en tomar

una alícuota de 20 μ l y se realizaron diluciones decimales seriadas con solución salina fisiológica estéril (0.85% NaCl) para obtener un volumen final de 200 μ l (Ravishankar *et al.*, 2008), de cada dilución se tomó una alícuota (10 μ l) y se realizó una siembra por goteo y condiciones de incubación previamente descritas. Pasado el tiempo de incubación se contaron las colonias y el resultado se expresó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Como controles de crecimiento se utilizaron las cepas que no tuvieron contacto con el extracto (control) y las cepas incubadas con el volumen de solvente utilizado para los extractos (blanco).

6.9 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

Para la incubación de huevecillos de *Artemia salina*, se preparó agua de mar artificial, de la siguiente manera: se pesaron 40 g de sal de mar (Coralife Scientific Grad Marine Salt) y 0.006 g de levadura de cerveza (Pronal Ultra) posteriormente se aforaron a un litro con agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.8. El procedimiento se realizó incubando 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) en el agua de mar artificial, colocándolos en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo iluminado con una lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz. A las 24 h los nauplios fueron pasados con la ayuda de una micropipeta a otro recipiente y mantenidos en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29°C por 24 h más. (Meyer *et al.*, 1982 y Solís *et al.*, 1993).

Los extractos a evaluar se encontraban resuspendidos en MeOH, así que antes de comenzar el ensayo se determinó la cantidad de dicho solvente que podrían resistir las artemias.

Al conocer la cantidad de solvente tolerable para los crustáceos; se realizaron los cálculos a partir de la concentración contenida en los viales ámbar ya mencionados anteriormente, para así evaluar las concentraciones de 1000, 750, 500, 250 y 100 ppm.

Para llevar a cabo la determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀), se tomaron los microlitros necesarios del cultivo de artemias (con 10 individuos), y se depositaron en cada pozo de una microplaca (6 repeticiones por extracto). Posteriormente se agregaron los microlitros necesarios de los extractos a probar, para dar un volumen final de 200 µl. Como control positivo se utilizaron dicromato de potasio 200, 400 ppm y agua de mar como control negativo. Esto se llevo a cabo por duplicado dando un total de 120 individuos por tratamiento. Después de aplicados los extractos, la placa se incubo por 24 h a 25°C. Posteriormente se contaron las artemias vivas con ayuda de un estereoscopio. Utilizando el método Probit se determinó la DL₅₀ (Meyer *et al.*, 1982 y Solís *et al.*, 1993).

6.10 Pruebas químicas realizadas a los extractos crudos

Se realizó una evaluación química de los extractos crudos para detectar la posible presencia de diversas familias de metabolitos secundarios. Se procedió según las metodologías descritas por Domínguez (1973) y Marcano & Hasegawa (2002), empleándose ciertas técnicas y reactivos como: permanganato de potasio para dobles enlaces, hidróxido de sodio para cumarinas, bicarbonato de sodio para grupo carboxilo, cloruro férrico para oxhidrilos fenólicos (Taninos), Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos, prueba de la espuma para saponinas, Shinoda para flavonoides, Antrona para carbohidratos, Dragendorff (Modificado) para alcaloides, Baljet para sesquiterpenlactonas y ácido sulfúrico para quinonas.

6.11 Aislamiento de fitoquímicos bioactivos

6.11.1 Extracción en reflujo tipo soxhlet.

Para realizar la purificación de los compuestos bioactivos, se realizaron extracciones sucesivas de una cantidad determinada de las plantas secas y trituradas, utilizando la extracción en reflujo soxhlet; comenzando con hexano, seguido de cloroformo y por último metanol (2 l aprox. de cada uno de estos solventes). Los

extractos con cada uno de los solventes se dejaron en reflujo durante 48 h. Después de esto, los extractos fueron concentrados hasta sequedad utilizando un rotavapor (Yamato BM 100), posteriormente se resuspendieron en el solvente apropiado para determinar el rendimiento de cada una de las extracciones, aunado a esto se realizaron las evaluaciones antimicrobianas de los extractos obtenidos mediante la técnica de difusión del pozo en agar, previamente mencionada, para los extractos obtenidos con el solvente polar (metanol) y para el caso de los extractos obtenidos con solventes no polares (hexano y cloroformo) se utilizará la técnica de difusión con discos de papel filtro, los cuales fueron impregnados con 50 μ l de los extractos, se dejó a temperatura ambiente durante 15 min para evaporar el solvente y posteriormente se colocaron sobre el agar MH en los cuales fueron respectivamente inoculados con las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, incubados de acuerdo a la metodología previamente descrita.

6.11.2 Bioautografía

Los extractos que presentaron actividad antimicrobiana fueron ensayados con la técnica de bioautografía. El extracto se colocó en la base de la capa fina (Silica Gel 60 Merck F₂₅₄) y se eluyó con los solventes que permitieron una buena separación, enseguida se colocó agar sobre la separación de los compuestos y se sembró el microorganismo en la superficie de este, finalmente se incubó de acuerdo a la metodología previamente descrita. La presencia de un halo de inhibición nos permitirá conocer la polaridad de la (s) molécula (s) de interés, esto dependiendo de la fase móvil utilizada para el ensayo. Este resultado fue interpolado a la cromatografía en columna.

6.11.3 Cromatografía en columna

Los extractos que presentaron actividad antimicrobiana contra las cepas probadas, fueron purificados, primeramente mediante cromatografía en columna (CC), utilizando Silica Gel grado técnico (Ca ~0.1%) 60Å formando una malla de 230-400 μ m (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Dicha silica fue lavada con MeOH, filtrada y llevada

hasta sequedad, después se activó en una estufa a 100° C por 2 h. La silica activada se utilizó para empacar una columna de 5 cm de diámetro y una altura de 40 cm.

Los extractos activos fueron eluidos utilizando diferentes combinaciones de cloroformo (CHCl₃) y metanol (MeOH), hasta 2 L por gradiente. Se empleó el uso de una lámpara UV con longitud de onda fija ($\lambda = 365$ nm en oscuridad) para coleccionar el solvente eluido ya fuera por bandas, color o volumen determinado según fuera el caso para una mejor separación.

Todas las fracciones obtenidas fueron concentradas en rotavapor utilizando la metodología previamente descrita. Una vez concentradas, las fracciones secas se resuspendieron en no más de 10 mL de MeOH y fueron colocadas en vasos de precipitado de 30 mL. A estas fracciones se les evaluó la pureza mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando cromatofolios de aluminio con Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck, DarmstadtGermany), con la finalidad de juntar las fracciones que tuvieron un alto grado de similitud (superior al 95%). A todas las fracciones resultantes se les determinó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión del pozo en agar la cual fue previamente descrita, con esto se seleccionaron las fracciones activas. Se llevó a cabo nuevamente la técnica de la bioautografía con dichas fracciones activas; esto para, identificar el o los compuesto (s) responsables de la actividad buscada, para continuar con el proceso de purificación por medio de una cromatografía en capa fina preparativa.

6.11.4 Cromatografía en capa fina preparativa

Las fracciones activas que mostraron inhibición por medio de la autobiografía (ubicando con ayuda del R_f al compuesto responsable) fueron subsecuentemente purificadas mediante cromatografía en capa preparativa (PLC), utilizando Silica Gel Tipo G de 5-15 μ m (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Para esto 25 g de silica fueron resuspendidas en 50 ml de dH₂O, la suspensión resultante se colocó en placas de vidrio de 20X20 cm, previamente lavadas y desengrasadas, dichas placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche, para eliminar el exceso de humedad,

transcurrido este tiempo las placas fueron activadas en una estufa a 80°C durante 1h. Los extractos se colocaron en la parte inferior de las placas aproximadamente a 1.5 cm del borde, con la ayuda de una micropipeta, aplicando puntos consecutivos de 7µl para formar una línea continua a lo ancho de la placa. Este proceso se repitió al menos 5 veces. Las placas fueron eluídas utilizando como fase móvil los solventes apropiados y a diferentes proporciones para seleccionar la mezcla más eficiente en la separación de los compuestos presentes en las fracciones. Las placas fueron retiradas del sistema cuando la fase móvil se encontraban aproximadamente a 1.5 cm del borde superior de la placa, una vez retiradas se realizaron observaciones bajo luz UV para observar con mayor claridad la separación de las bandas.

Las bandas responsables de la actividad fueron raspadas y recuperadas en el solvente de extracción (MeOH), se filtraron con papel Whatman No. 1 y se guardaron en viales ámbar hasta corroborar su grado de pureza con ayuda de una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

6.11.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para conocer la pureza de las bandas activas obtenidas, se llevó a cabo una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para esto se utilizó un equipo Perkin Elmer Series 200 el cual cuenta con un automuestreador, cuatro reservorios para fase móvil, esta acoplado a un detector UV-Vis con arreglo de diodos. Se realizaron pruebas a diferentes longitudes de onda, igualmente con diferentes concentraciones de solventes, para obtener el mejor resultado dependiendo de la banda activa que fue purificada.

6.12 Pruebas químicas y comparaciones contra estándares realizadas a la banda activa

Al determinar el grado de pureza del o los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana se realizaron pruebas químicas para conocer el grupo químico al que pertenecen los metabolitos extraídos. Posteriormente el o los compuestos fueron comparados con estándares específicos de acuerdo al tipo de compuesto identificado;

bajo condiciones específicas, para cada grupo de compuestos (fase móvil, fase estacionaria, reveladores) (Wagner & Blatt, 2003).

6.13 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la banda activa en *S.aureus*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Para finalizar con el análisis de la fracción activa, se realizó una evaluación de su actividad antimicrobiana sobre las cepas en estudio; lo anterior se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente, donde las bacterias fueron activadas, sembradas en agar MH y la fracción fue probada por la técnica de difusión del pozo en agar.

6.14 Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de *S.aureus*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Para evaluar la susceptibilidad a diferentes antibióticos se llevó a cabo la metodología propuesta por Morales *et al.*, (2006); para ello se activaron y sembraron las cepas en estudio de acuerdo a la metodología previamente descrita en la sección 6.5. Después de inocular el agar, se dejó secar 5 min y se colocó el Multidisco Gram Negativos II o el Multidisco Gram Positivos II ambos de la marca BIO-RAD. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente se midieron los halos de inhibición y se determinó la susceptibilidad siguiendo los diámetros para resistencia, intermedio y sensible que marca el fabricante.

6.15 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, al menos en tres repeticiones. El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago IL). Los resultados se analizaron mediante la prueba de Varianza, comparación múltiple de medias y análisis PROBIT (cuando fue necesario) con un valor de significancia $P \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención y rendimiento de los extractos

Para la obtención de los extractos crudos, se utilizaron diferentes gramos de planta seca y triturada, así mismo diferentes volúmenes de metanol absoluto (MeOH), dependiendo de la cantidad del material vegetal obtenido. Después de la extracción se obtuvo el rendimiento para cada una de las plantas registrando un rango de 3.16 g para *Atriplex canescens* que fue la de menor rendimiento y 14.4 g para *Prosopis laevigata* que fue la mayor rendimiento (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimientos obtenidos de los extractos metanólicos preliminares de las plantas en estudio

Planta	Rendimiento % (p/p)
<i>Atriplex canescens</i>	3.16
<i>Sophora secundiflora</i>	5.64
<i>Yucca filifera</i>	5.69
<i>Nothoscordum bivalve</i>	5.70
<i>Gutierrezia microcephala</i>	6.93
<i>Prosopis laevigata</i>	14.4

7.2 Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana

De todas las plantas analizadas, aquella con menor actividad fue la *Yucca filifera* (sólo inhibiendo a *A. baumannii* con un rango de inhibición 1.36 ± 0.09 cm) y las de mayor actividad fueron *Nothoscordum bivalve* y *Prosopis laevigata* con rangos de inhibición entre 1.33 ± 0.12 cm y 2.43 ± 0.27 cm, ambas afectaron a los tres microorganismos en estudio como puede apreciarse en la Tabla 3. Con los resultados obtenidos, se seleccionaron 3 de las 6 plantas (*Atriplex canescens*, *Nothoscordum bivalve* y *Prosopis laevigata*); ya que éstas, presentaron actividad en contra de los tres microorganismos en estudio.

Tabla 3. Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de las plantas en estudio.

Planta	Inhibición (cm)		
	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Atriplex canescens</i>	1.48±0.24**	1.73±0.28	1.54±0.61
<i>Sophora secundiflora</i>	1.75±0.26	NI*	1.70±0.20
<i>Yucca filifera</i>	1.36±0.09	NI	NI
<i>Nothoscordum bivalve</i>	2.03±0.39	2.10±0.50	1.33±0.12
<i>Gutierrezia microcephala</i>	1.45±0.25	1.82±0.30	NI
<i>Prosopis laevigata</i>	1.58±0.13	2.43±0.27	1.53±0.35

*NI: No Inhibición; **Desviación estandar

Después de seleccionar las plantas que presentaron la mayor actividad antimicrobiana, se llevó a cabo una nueva colecta, con el fin de obtener material vegetal suficiente para los ensayos subsecuentes. Sin embargo, en el caso de *N. bivalve* no fue encontrada, debido a que esta sólo florea a principios de la primavera (entre los meses de Marzo y Mayo). Por esta razón se solo se coelctaron las plantas *A.canescens* y *P. laevigata*.

7.3 Determinación de la concentración de los extractos crudos

Despues del proceso de extracción y resuspensión de los extractos, se procedió a determinar la concentración de los mismos, la cual fue expresada en mg/ml. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración de los extractos crudos de las plantas seleccionadas.

Extracto	Concentración (mg/ml)
<i>Atriplex canescens</i>	292.5
<i>Prosopis laevigata</i>	171.5

7.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La obtención de la CMI y la CMB de los 2 extractos se realizó como se explica en la sección 6.7. En los resultados obtenidos se observa que el extracto con mayor actividad antimicrobiana fue el de *P. laevigata* con un rango de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que van desde 0.7 a 10.2 mg/ml, de acuerdo a la cepa probada, mientras que el extracto de *A. canescens* presentó rangos de 5.2 a 13.7 mg/ml (Fig. 1). Por su parte las concentraciones mínimas bactericidas quedaron de la siguiente forma: *P. laevigata* fue el más activo con rangos de 0.17 a 10.2 mg/ml dependiendo de la cepa y para *A. canescens* los rangos fueron de 4.6 a 12.7 mg/ml (Fig. 2) Además es destacable que *S. aureus* fue a cepa mas susceptible a los extractos y *P. aeruginosa* la mas resistente a los dos extractos (Fig. 1 y Fig. 2).

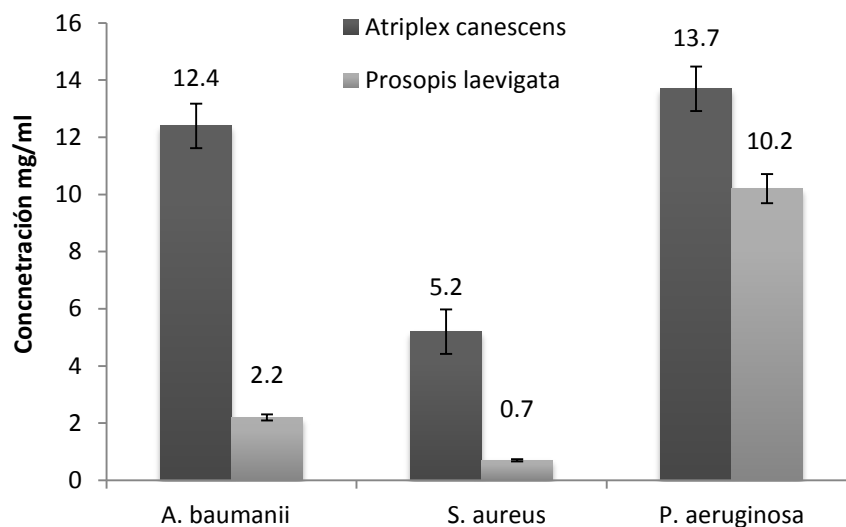


Figura 1. CMI para los extractos de las plantas sobre los microorganismos en estudio.

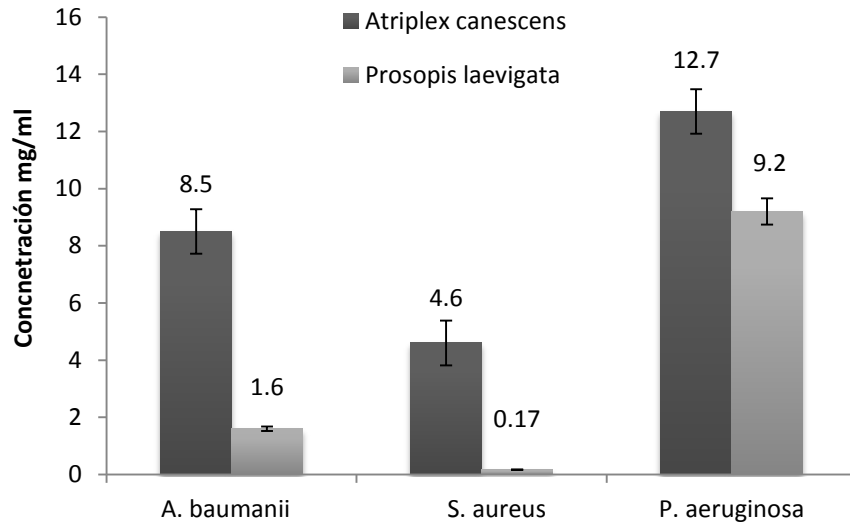


Figura 2. CMB para los extractos sobre los microorganismos en estudio.

La Figura 3 muestra la técnica de microdilución utilizada para la determinación de la CMI, pueden observarse que en determinados pocillos existe ausencia de crecimiento (no hay turbidez) y en otros existe crecimiento bacteriano (turbidez). Cada pocillo contenía una concentración diferente de extracto.



Figura 3. Determinación de la CMI y la CMB para los extractos con actividad.

La Figura 4 muestra la técnica de siembra por goteo (Miles y Misra) utilizada para la determinación de la CMB. Puede apreciarse que cada gota proviene de una concentración determinada; se observa que la placa contiene una replica del ensayo y existe disminución de la cantidad de bacteria entre las concentraciones de 4 y 5 mg/ml. Así mismo se aprecia crecimiento abundante en los controles

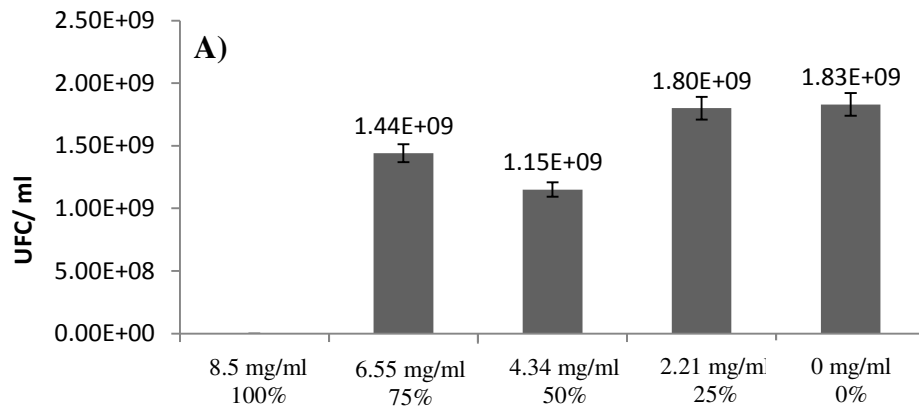


Figura 4. Resultados de siembra por goteo (Miles y Misra) de los extractos activos.

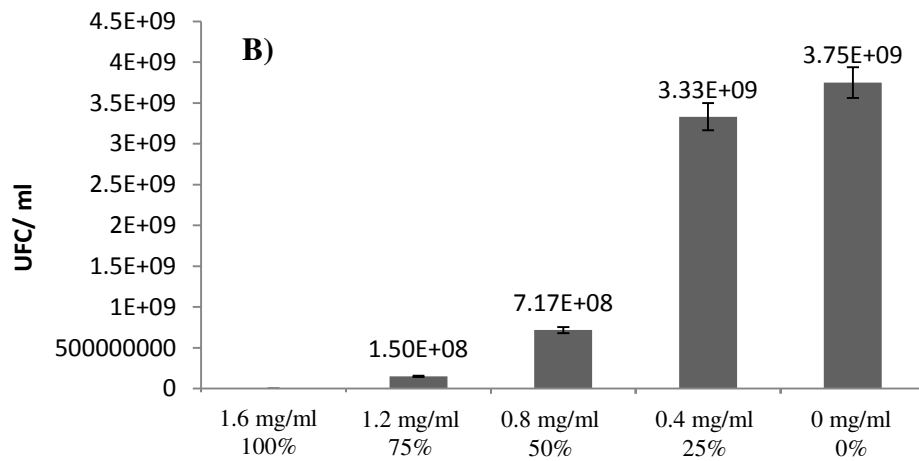
7.5 Determinación del efecto de concentraciones subletales sobre el crecimiento de microorganismos del grupo ESKAPE

Los resultados obtenidos para el efecto de las concentraciones subletales (75, 50 y 25 % de la CMB) sobre el crecimiento de los microorganismos se describen a continuación.

Para *A. baumannii*, existe solamente una ligera alteración en su crecimiento para las concentraciones de, 75 y 50 % del extracto de *P. laevigata*, pero no resultaron ser significativas, una reducción de 10^9 UFC/ml (control) a 10^8 UFC/ml para ambas concentraciones (Figura 5).



Concentraciones subletales del extracto



Concentraciones subletales del extracto

Figura 5. Efecto de concentraciones subletales de A) *A. canescens* y B) *P. laevigata* sobre el crecimiento de *A. baumannii*.

Para *S. aureus* ambos extractos afectaron significativamente el crecimiento de dicho microorganismos a las concentraciones subletales del 75 y 50%; afectandose mayormente al 75% para *A. canescens* con una reducción de 10^9 UFC/mL (control) a 10^4 UFC/mL y al 75% para *P. laevigata* con una reducción de 10^9 UFC/mL (control) a 10^2 UFC/mL (Figura 6).

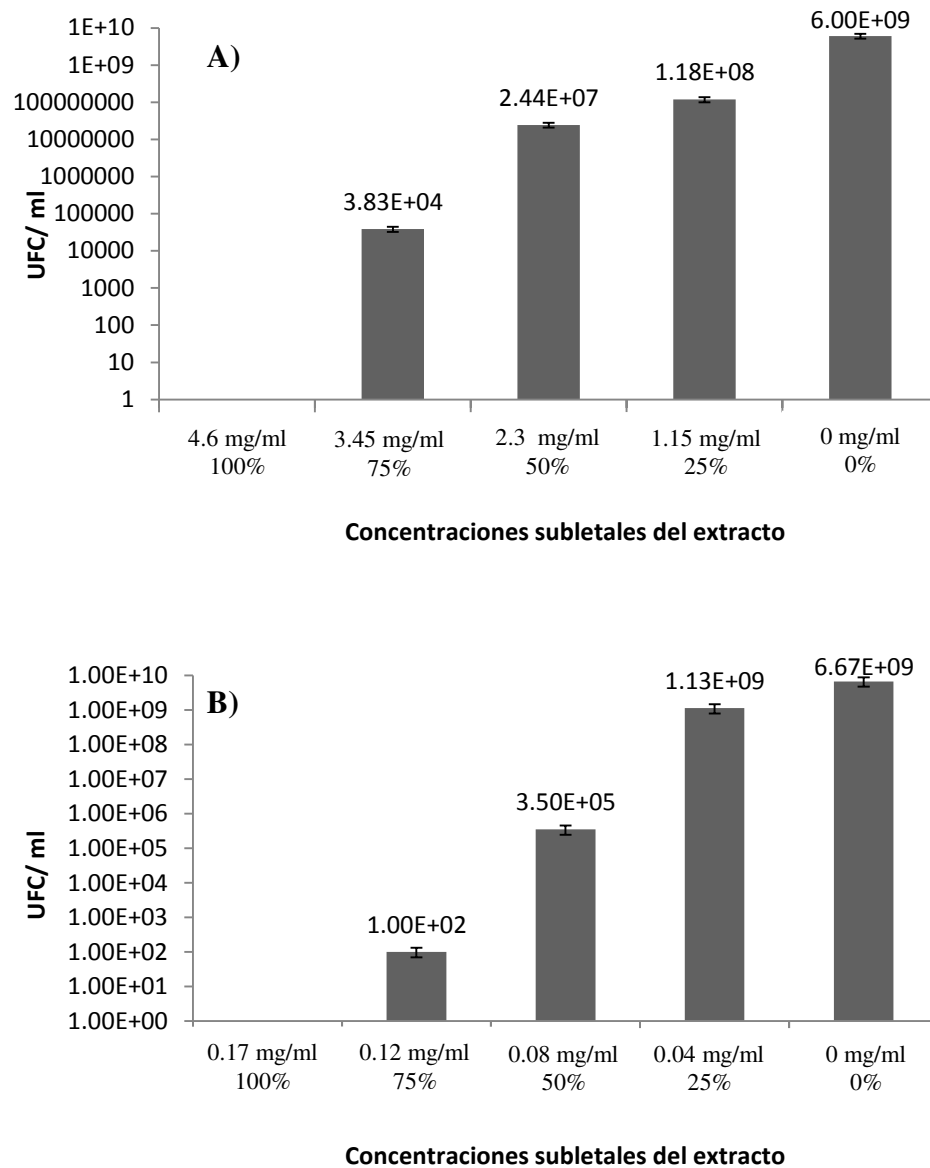


Figura 6. Efecto de concentraciones subletales de A) *A. canescens* y B) *P. laevigata* sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Y para *P. aeruginosa*, existe solamente una ligera alteración en su crecimiento para las concentraciones de 75 y 50% del extracto de *P. laevigata* pero no resultaron ser significativas, una reducción de 10^9 UFC/ml (control) a 10^8 UFC/ml para ambas concentraciones (Figura 7).

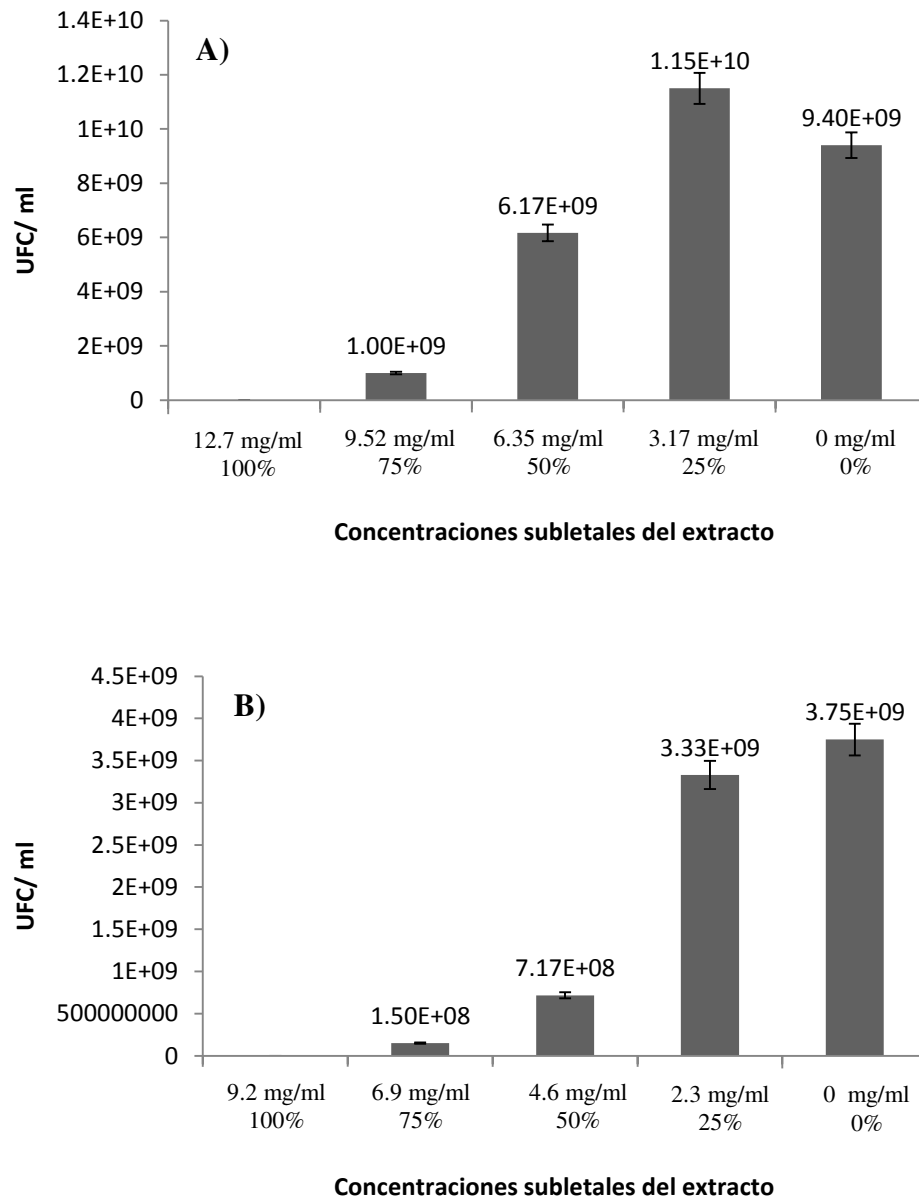


Figura 7. Efecto de concentraciones subletales de A) *A. canescens* y B) *P. laevigata* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Para corroborar que el MeOH (solvente en el cual estaban disueltos los extractos), no era el causante del efecto sobre el crecimiento de los microorganismos, se llevaron a cabo blancos; los cuales contenían diferentes volúmenes de dicho solvente los resultados como puede apreciarse en la Figura 8 para A) *A. baumannii*, B) *S. aureus* y C) *P.s aeruginosa*. Se puede apreciar que los diferentes volúmenes de solvente no afectan el significativamente el crecimiento de los microorganismos en estudio.

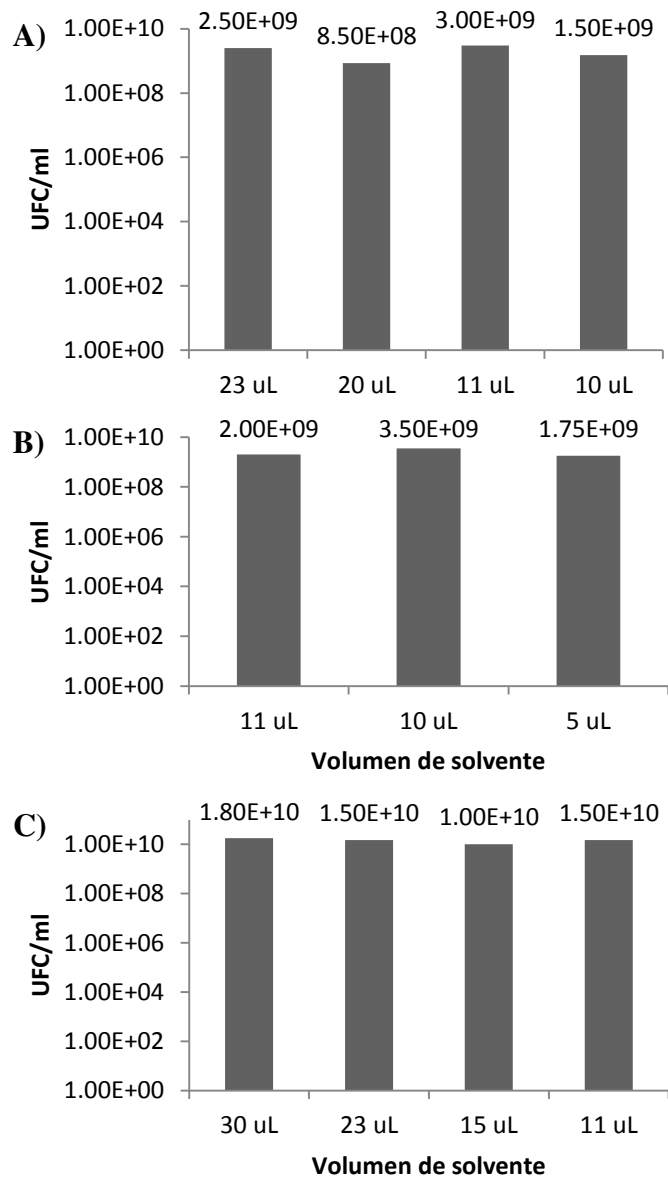


Figura 8. Crecimiento de *Acinetobacter baumannii* (A), *Staphylococcus aureus* (B) y *Pseudomonas aeruginosa* (C) en diferentes concentraciones de Metanol (blanco).

La Figura 9 muestra los resultados para *A. baumannii* al sembrar por goteo las diluciones de las concentraciones subletales. Puede apreciarse una disminución del número de UFC de manera sucesiva debido a las diluciones empleadas pero no se afectó el crecimiento. En la parte superior de la placa no se observa crecimiento debido a que se trata del 100% del extracto (CMB) enseguida se evaluaron el 75, 50, 25 y 0 % del extracto.

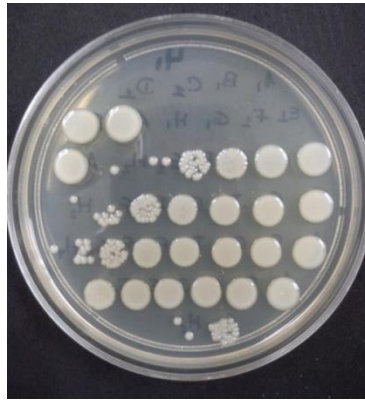


Figura 9. Efecto de la concentración subletal sobre el crecimiento *A. baumannii* (microdilución).

7.6 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* para los extractos crudos

Los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad se resumen en la Tabla 5; en ella se aprecian el número de individuos muertos por cada tratamiento, para el control de KMnO_4 en ambas concentraciones los 120 individuos murieron. Así mismo se observa que a pesar de que en todas las concentraciones de *A. canescens* existe una respuesta, esta permanece de manera constante a diferencia de *P. laevigata*. En la Tabla 5 no se incluyeron los controles de agua salada así como los blancos de metanol ya que no hubo efecto sobre la *Artemia salina* en ambos tratamientos.

Tabla 5. Toxicidad de los extractos crudos de *Atriplex canescens* y *Prosopis laevigata* sobre *Artemia salina*.

Extracto	[] ppm	Nauplios <i>A. salina</i>	
		Muertos	Vivos
<i>Atriplex canescens</i>	100	90	30
	250	100	20
	500	91	29
	750	104	16
	100	110	10
<i>Prosopis laevigata</i>	100	23	97
	250	52	68
	500	76	44
	750	71	49
	100	66	54
KMnO₄	100	120	0
	300	60	0

Con los resultados obtenidos se llevó a cabo un análisis PROBIT utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago IL) para determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) y se obtuvo que para *A. canescens* la DL₅₀ resultó se de 858 ppm; que de acuerdo a la ponderación recomendada por Sánchez *et al.*, 2005, el extracto de considera ligeramente toxico. De igual forma se obtuvo la DL₅₀ para *P. laevigata* arrojando un resultado de 449 ppm, por lo que en este caso resulta que el extraco es moderadamente toxico.

7.7 Pruebas químicas realizadas a los extractos crudos

Como los extractos crudos presentaron actividad biológica es primordial conocer los tipos de metabolitos secundarios que estos pueden contener. En la Tabla 6 se resumen los resultados obtenidos con respecto al tamizaje fitoquímico.

Tabla 6. Tamizaje fitoquímico de los extractos crudos de las plantas de mayor actividad biológica.

Prueba química	Extractos de plantas	
	<i>Atriplex canescens</i>	<i>Prosopis laevigata</i>
KMNO ₄ (Dobles enlaces)	+	-
Liebermann-Burchard (Esteroles y Triterpenos)	-	+
NaOH (Cumarinas)	+	+
Dragendorff (Alcaloides)	-	+
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	+	-
H ₂ SO ₄ (Quinonas)	+	-
NaHCO ₃ (Grupo Carboxilo)	-	-
FeCl ₃ (Taninos)	+	+
Espuma (Saponinas)	-	-
Antrona (Carbohidratos)	+	+
Shinoda (Flavonoides)	+	+

7.8 Aislamiento de fitoquímicos bioactivos

7.8.1 Extracción en reflujo tipo soxhlet

Para *A. canescens* se pesaron 260 g de planta seca y triturada la cual fue puesta en reflujo con aproximadamente 1 l de hexano, de este extracto se obtuvo un rendimiento de 2.35 % (p/p), posteriormente se cambió el solvente a cloroformo (aprox. 1000 ml) obteniendo un rendimiento de 4.11 % y finalmente a metanol (aprox. 1000 ml) obteniendo un rendimiento de 10.26 %. A cada uno de estos extractos obtenidos de *A. canescens* se les evaluó la actividad antimicrobiana como se describió previamente, obteniéndose como resultado que únicamente solo el extracto metnólico presentó inhibición con un promedio de 1.8 ± 0.1 cm de diámetro (Figura 10).

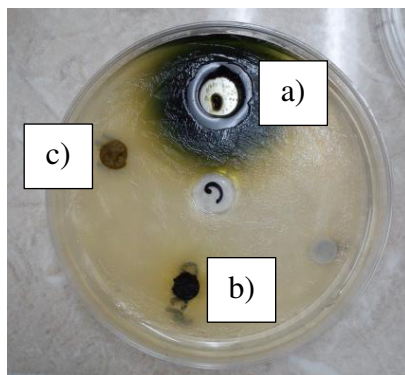


Figura 10. Actividad antimicrobiana de los extractos (Soxhlet); a) Metanólico, b) Clorofórmico y c) Hexánico.

P. laevigata fue sometida por el mismo procedimiento de extracción consecutiva antes mencionado (hexano, cloroformo y metanol), solamente que para esta planta se colocaron en refluxo 450 g de planta seca y triturada. Del extracto hexánico se obtuvo un rendimiento 3.02 %, del clorofórmico 3.17 % y finalmente del metanólico 18.73 %. Los extractos de *P. laevigata*, fueron sometidos a evaluación de la actividad antimicrobiana, obteniéndose como resultado solo inhibición por parte del extracto metanólico con un promedio de 2.1 ± 0.1 cm de diámetro.

7.8.2 Bioautografía

Del extracto metanólico obtenido por Soxhlet de *A. canescens* se llevó a cabo la técnica de autobiografía; primero se definió la fase móvil que presentó mejor resolución en la separación de compuestos, la cual fue determinada como Metanol: Acetato de Etilo:Hexano (2:2:1) para posteriormente realizar la autobiografía. Sin embargo el extracto presentó una considerable cantidad de contaminantes no polares (la mayoría pigmentos) lo que impedía visualizar el resultado, por lo que se procedió a realizar una serie de lavados con Hexano, después de los lavados se obtuvieron aproximadamente 3 g de dichos compuestos, posteriormente el extracto fue resuspendido en metanol, filtrado y almacenado en viales ámbar hasta su uso. Ya con el extracto tratado se replitió la de bioautografía logrando visualizar una zona de inhibición con un Rf aproximado de 0.92 (Figura 11).

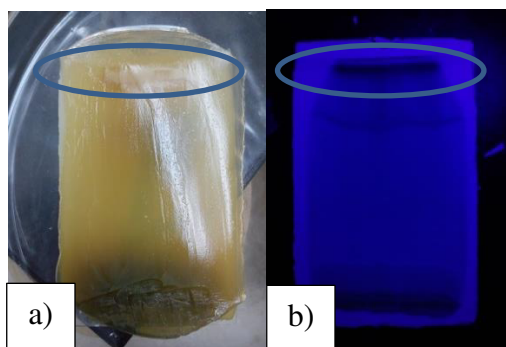


Figura 11. Bioautografía del extracto metanólico de *A. canescens* (Soxhlet) sobre *S. aureus*, a) Visible y b) UV.

La cromatografía para el extracto de *P. laevigata*, cuya fase móvil fue cloroformo:metanol (7:3) posteriormente se realizó la autobiografía obteniéndose una zona de inhibición con Rf's entre 0.33 y 0.62 (Figura 12).

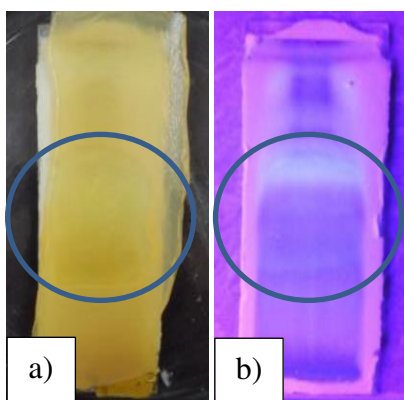


Figura 12. Bioautografía del extracto metanólico de *P. laevigata* (Soxhlet) sobre *S. aureus*, a) Visible y b) UV.

7.8.3 Cromatografía en columna

Posteriormente se procedió a la purificación del extracto de *A. canescens* utilizando cromatografía en columna, para lo cual 7 g del extracto seco se montó una en columna cromatográfica y se comenzó la elución de la columna utilizando como fase móvil mezclas de cloroformo:metanol en las siguientes proporciones: 10:0, 9.5:0.5, 9:1, 8.5:1.5, 8:2, 7.5:2.5, 7:3, 6.5:3.5, 6:4, 5.5:4.5 y MeOH absoluto.

Se colectaron 52 fracciones a las cuales se les evaluó su similitud mediante cromatografía en capa fina, las fracciones con aproximadamente 95% de similitud se mezclaron para finalmente obtener 27 fracciones (Figura 14). Una vez mezcladas se les evaluó la actividad antimicrobiana, estos resultados se muestran en la Tabla 7, donde se aprecia que las fracciones obtenidas con el gradiente cloroformo:metanol 9:1 y 8.5:1.5 contenían la actividad buscada.

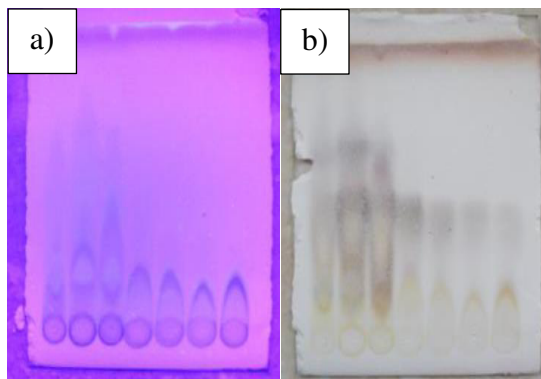


Figura 14. Fraccionamiento del extracto de *A. canescens* por cromatografía en columna eluida con un gradiente cloroformo:metanol a) UV y b) Cloruro de cobalto. Carril 1 = Gradiente 9.5:0.5. Carril 2 = 9:1. Carril 3 = 8.5:1.5. Carril 4 = 8:2. Carril 5 = 7.5:2.5. Carril 6 = 6:4. Carril 7 5.5:4.5.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de *A. canescens* sobre *S. aureus*.

Solvente(s)	No. de fracciones	Actividad antibacteriana
Cloroformo: Metanol		
CHCl₃	2	-
9.5/0.5	3	-
9/1	3 (2 activas)	+
8.5/1.5	5 (3 activas)	+
8/2	2	-
7.5/2.5	2	-
7/3	2	-
6.5/3.5	2	-
6/4	2	-
5.5/4.5	2	-
Metanol	2	-

La cromatografía en columna se realizó para el extracto metanólico de *P. laevigata* (Figura 15) para lo cual se montaron 7 g del extracto, los cuales se eluyeron con mezclas de solventes a polaridades crecientes, de la misma forma que para el extracto de *A. canecens*, después del proceso de comparación por TLC (Figura 16), se obtuvieron 27 fracciones a las cuales se les evaluó su actividad antimicrobiana (Tabla 8).



Figura 15. Elución de la columna cromatográfica de *P. laevigata*.

En la Figura 16 se puede apreciar la comparación por TLC de las fracciones obtenidas de la columna de *P. laevigata* con la elución de cloroformo y cloroformo:metanol.



Figura 16. Fraccionamiento del extracto de *P. laevigata* por cromatografía en columna eluída con un gradiente cloroformo:metanol. Carril 1 = 10:0. Carril 2 = 9.5:0.5. Carril 3 = 9:1. Carril 4 = 8.5:1.5. Carril 5 = 8:2.

La Tabla 8 muestra los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones semejantes; se apreciaba que las fracciones obtenidas del gradiente 8:2 al 6:4 cloroformo:metanol contenían la actividad buscada.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante la columna cromatográfica de *P. laevigata*.

Solvente(s)	No. de fracciones	Actividad antibacteriana
Cloroformo: Metanol		
10/0	3	-
9.5/0.5	3	-
9/1	1	-
8.5/1.5	3	-
8/2	2 (1 con actividad)	+
7.5 /2.5	3	+
7/3	2	+
6.5/3.5	2	+
6/4	2	+
5.5/4.5	2	-
1/1	1	-
MeOH	3	-

En la Figura 17 se aprecia parte de la evaluación antimicrobiana de la mezcla de fracciones de la columna de *P. laevigata*; cada mezcla de fracciones fue enumerada al momento de hacer la prueba, el 1 representa la mezcla de fracciones del gradiente 8:2 cloroformo:metanol, el 2 representa el gradiente 7.5:2.5 y así sucesivamente hasta el gradiente de 6:4.

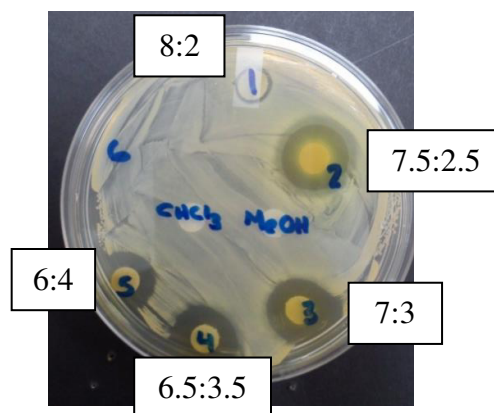


Figura 17. Actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante la columna cromatográfica de *P. laevigata* sobre *S. aureus*.

Las fracciones 2, 3, 4 y 5 fueron mezcladas ya que presentaron actividad antimicrobiana, obteniéndose proximadamente 480 mg. Asimismo, se les realizaron las pruebas con el reactivo Marquis y Dragendorff siendo específicos para alcaloides, ambos resultaron positivos. La purificación de los compuestos responsables de la actividad para *P. laevigata* se quedó hasta este punto, fracción rica en alcaloides.

A las dos fracciones de *A. canescens* que presentaron actividad antimicrobiana se les comparó y se obtuvo una similitud entre ellas; una banda color amarillo (revelada con cloruro de cobalto), obtenida con una fase móvil Benceno:Acetona 7:3, con un R_f aproximado de 0.58 y asimismo dicha banda era visible a una $\lambda = 365$ nm emitiendo un color azul brillante. Ambas fracciones se mezclaron, obteniéndose aproximadamente 660 mg esto para realizar una nueva autobiografía y se obtuvo inhibición en esa región (R_f 0.58 aproximadamente) (Figura 17).

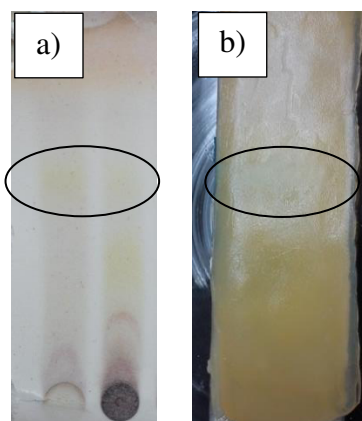


Figura 18. a) Fracciones activas de *A. canescens* y b) bioautografía de la unión de ambas fracciones.

7.8.4 Cromatografía en capa fina preparativa

Al ser identificada la banda responsable de la actividad se continuó con la purificación de la misma, para esto se llevaron a cabo cromatografías preparativas como se explicó previamente en la sección 6.11.4 con el fin de separar la banda del resto de los componentes de la fracción activa (Figura 19).

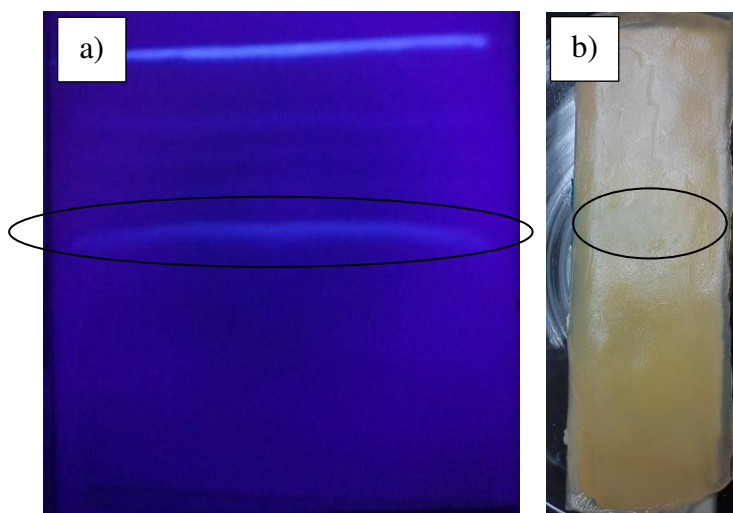


Figura 19. Cromatografía en capa preparativa de la fracción activa eluídas con Benceno: Acetona 7:3 de *A. canescens* a) UV; y b) bioautografía positiva.

La banda fue raspada, recuperada y almacenada como se describió anteriormente. Se obtuvo un rendimiento aproximado de 25 mg, posteriormente se continuó con la valoración de la pureza mediante HPLC.

7.8.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Para verificar la pureza del compuesto recuperado de las cromatografías en capa fina preparativas se utilizó un equipo HPLC. Las condiciones del equipo fueron:

- Volumen de la muestra: 20 μ l
- Concentración de la muestra: 1.8 mg/ml (aproximadamente)
- Columna: C-18 fase reversa
- Longitud de la columna: 15 cm
- Tamaño de partícula: 0.5 μ m.
- Diámetro de la columna: 4.5 mm
- Fase móvil: Metanol: Acetonitrilo 1:1
- Flujo: 1 ml/min
- Presión: 6000 psi
- Temperatura ambiente: 25 °C
- Arreglo de diodos

Canal A: 280 nm y Canal B: 220 nm

Las Figuras 20 (Canal A) y 21 (Canal B) muestran los resultados obtenidos para el compuesto activo de *A. canescens*, en ambas Figuras puede apreciarse la banda activa con un tiempo de retención de 3.2; se determinó que la fase móvil estaba situada en el tiempo de retención de 2.

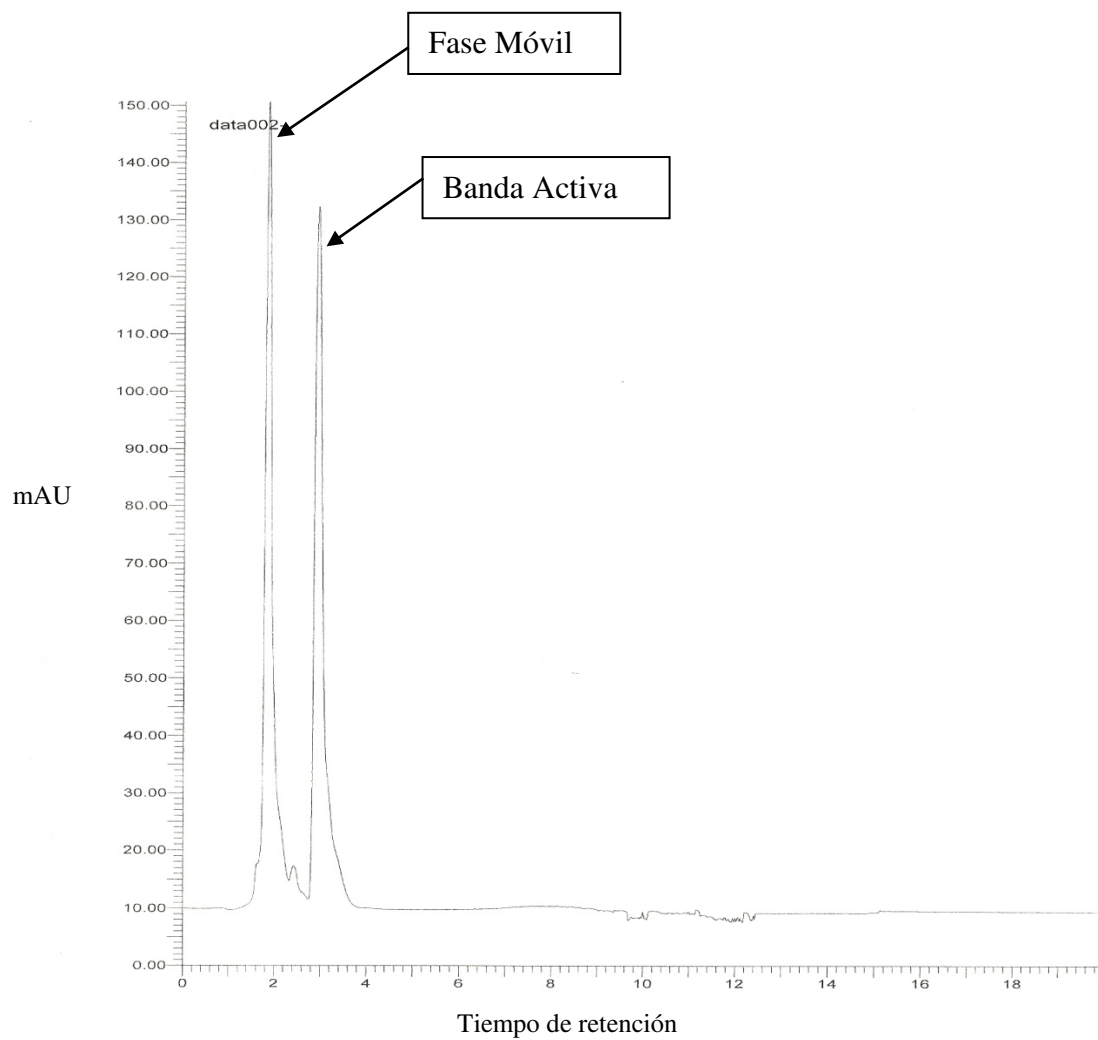


Figura 20. Cromatograma de HPLC de la banda activa de *A. canescens* en el canal A ($\lambda=280$ nm).

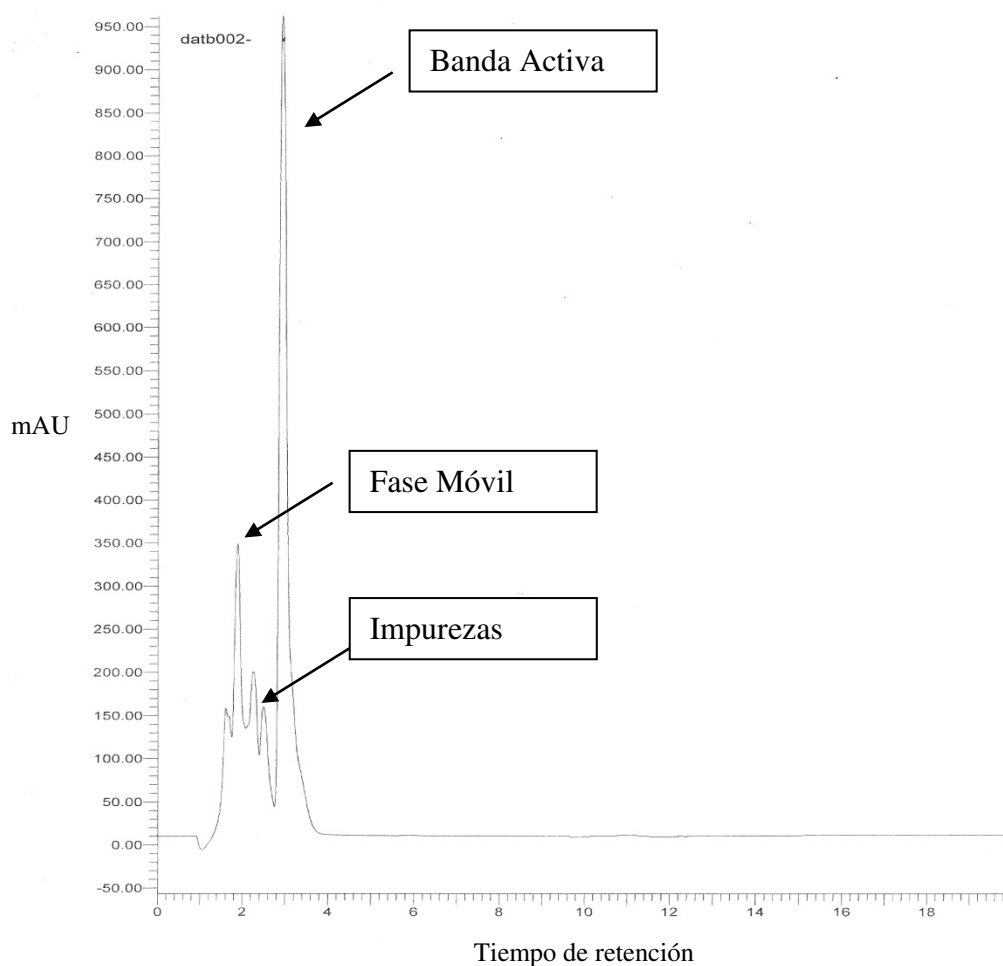


Figura 21. Cromatograma de HPLC de la banda activa de *A. canescens* en el canal B ($\lambda = 220$ nm).

7.9 Pruebas químicas y comparaciones contra estándares realizadas a la banda activa

Se observa que la banda activa tiene un grado considerable de pureza, por lo tanto se llevaron a cabo pruebas químicas con la banda activa; se encontró que dicho compuesto contiene carbohidratos (antrona positivo) y cumarina (hidróxido de sodio positivo). Se llevó a cabo una cromatografía en capa fina (Benceno:Acetona 7:3) para corroborar lo antes mencionado (Figura 22).

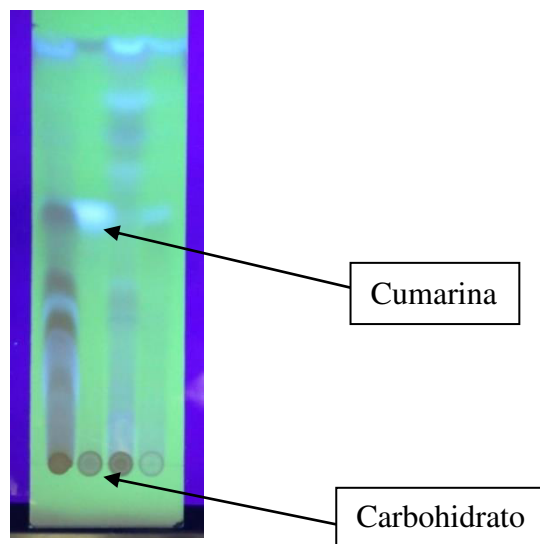


Figura 22. Cromatografía en capa fina de *A. canescens*. Carriles 1: extracto crudo. Carril 2: banda activa. Carril 3: Gradiente de la columna 9:1. Carril 4. Gradiente de la columna 8.5:1.5.

En la comparación se puede observar que la banda activa se encuentra en todas las muestras con actividad, en el extracto crudo se encuentra empalmada junto a otra región de compuestos, en las fracciones activas de la columna se aprecia pero en menor cantidad.

Debido a la polaridad de la cumarina (no polar) se observa que esta pudo eluir en la fase móvil utilizada; sin embargo, este no fue el caso de los compuestos en la base de la banda activa, ya que al ser una fase móvil no polar, los compuestos polares (carbohidratos) simplemente no eluyeron.

Posteriormente, se realizó una revisión bibliográfica, utilizando literatura especializada (Wagner y Bladt, 2003), donde se determinó que la mejor fase estacionaria y fase móvil para separar cumarinas son la Silica Gel 60 Merck F₂₅₄ con una fase móvil establecida con Tolueno:Éter 1:1 (saturado al 10% de ácido acético) y visualizando a una $\lambda = 365$ nm (sin tratamiento químico), por lo que se procedió a eluir el compuesto aislado bajo estas condiciones, obteniéndose un Rf de aproximadamente 0.482, este Rf se comparó con los Rf's de la literatura, encontrando que los Rf's más aproximados a la muestra pertenecen a la xantotoxina y la oxypeucedanina, ambas pertenecientes al grupo de las furanocumarinas.

7.10 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la fracción activa en *S.aureus*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Durante todo el aislamiento del compuesto responsable de la actividad antimicrobiana, se utilizó como referencia al microorganismo *S.aureus*; debido a la baja concentración utilizada de los extractos para inhibir su crecimiento.

Al obtener una cantidad de tan sólo 25 mg de banda activa, de un total de 7 g de extracto metanólico, se decidió evaluar su actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en pozo. Esto debido a que la cantidad era muy poca para obtener nuevas CMI y CMB de los microorganismos en estudio, asimismo por la serie de pruebas realizadas a dicha banda que disminuyó su cantidad considerablemente. Para ello se preparó una concentración de 4.5 mg/ml y se procedió como ya se explicó en la sección 6.5 con algunas modificaciones; al conocer la concentración de la banda activa a evaluar, se agregaron 150 μ l (67.5 μ g), 250 μ l (112.5 μ g) y 350 μ l (157.5 μ g) para inhibir el crecimiento *S. aureus*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* respectivamente por la técnica de difusión en pozo.

Como resultados se obtuvo inhibición positiva en *S.aureus* con un diámetro de 1.2 cm, inhibición negativa en contra de *A. baumannii* y con respecto a *P. aeruginosa* se obtuvo reducción de crecimiento con un radio de 1.3 cm.

7.11 Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de *S.aureus*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Finalmente se evaluó la susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de los microorganismos nosocomiales en estudio. *S. aureus* presentó resistencia a 4 de 12 antibióticos (Tabla 9); *A. baumannii* mostró alta resistencia ya que de 19 antibióticos fue resistente a 18 (Tabla 10) y *P. aeruginosa* (Tabla 11) presentó resistencia a 8 de 12 antibióticos.

Tabla 9. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de *S.aureus*.

Antibiótico	Concentración	Resultado
Ampicilina	10 µg	Resistente
Cefalotina	30 µg	Sensible
Cefepime	30 µg	Resistente
Cefotaxima	30 µg	Sensible
Cefuroxima	30 µg	Sensible
Dicloxacilina	1 µg	Sensible
Eritromicina	15 µg	Sensible
Gentamicina	10 µg	Resistente
Levofloxacina	5 µg	Sensible
Penicilina	10 U	Resistente
Tetraciclina	30 µg	Sensible
Trimetoprima/sulfametoxazol	25 µg	Sensible

Tabla 10. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de *A. baumannii*.

Antibiótico	Concentración	Resultado
Ampicilina/Sulbactama	20 µg	Resistente
Amikacina	30 µg	Resistente
Ampicilina	10 µg	Resistente
Amoxicilina/Clavulanato	20 µg / 10 µg	Resistente
Cefalotina	30 µg	Resistente
Cefepime	30 µg	Resistente
Cefotaxima	30 µg	Resistente
Ceftazidima	30 µg	Resistente
Ceftriaxona	30 µg	Resistente
Ciprofloxacino	5 µg	Resistente
Clindamicina	2 µg	Resistente
Cloranfenicol	30 µg	Resistente
Gentamicina	10 µg	Resistente
Imipenem	10 µg	Sensible
Levofloxacina	5 µg	Resistente
Netilmicina	30 µg	Resistente
Nitrofurantoína	30 µg	Resistente
Penicilina	10 U	Resistente
<i>Trimetoprima/sulfametoxazol</i>	25 µg	Resistente

Tabla 11. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Concentración	Resultado
Amikacina	30 µg	Sensible
Ampicilina	10 µg	Resistente
Cefalotina	30 µg	Resistente
Cefepime	30 µg	Sensible
Cefotaxima	30 µg	Resistente
Ceftriaxona	30 µg	Resistente
Cloranfenicol	30 µg	Resistente
Gentamicina	10 µg	Resistente
Levofloxacina	5 µg	Sensible
Netilmicina	30 µg	Sensible
Nitrofurantoína	30 µg	Resistente
<i>Trimetoprima/sulfametoxazol</i>	25 µg	Resistente

8. DISCUSIÓN

Las técnicas generales de extracción en plantas incluyen maceración, infusión, percolación, digestión, decocción, calor continuo (Soxhlet), alcohol-agua por fermentación, contra corriente, asistida por microondas, con ultrasonido (sonicación), utilizando fluidos supercríticos entre otras (Pandey & Tripathi, 2014). La maceración consiste en colocar la planta triturada en un contenedor con tapón en el cual se tenga contacto con el solvente por un tiempo determinado ya sea con o sin agitación (Farnsworth & Soejarto, 1991); este método general de extracción por ser fácil y sencillo de llevar a cabo fue seleccionado para nuestras plantas en estudio. De igual manera Pandey & Tripathi (2014) realizaron una investigación exhaustiva y encontraron que el solvente que puede extraer mayor cantidad de compuestos de una planta es el Metanol, pero no descartan la especificidad de otros solventes para la extracción de determinados compuestos. Es por lo anterior que el extracto crudo preliminar fue obtenido con dicho solvente.

El rendimiento de extracción de la planta seleccionada o parte de esta nos permite comparar; ya sea por un uso diferente de solventes (Carrillo *et al.*, 2011), por una temporada específica de colecta (Mila-Arango *et al.*, 2014) o entre diferentes muestras (López *et al.*, 2010) cual la mejor opción para obtener un buen resultado en ese estudio o futuras investigaciones. Siendo este el caso para las plantas seleccionadas, todos los datos recabados en cuanto a rendimiento serán utilizados en futuras investigaciones.

La evaluación de la actividad antimicrobiana con el método de difusión del pozo en agar o dilución en caldo han sido ampliamente utilizadas para seleccionar extractos con resultados positivos; por ejemplo, Salinas *et al.* (2009) preparó 22 extractos de nueve plantas diferentes entre ellas de *P. laevigata*, los extractos con metanol y acetona para las hojas y el tronco de esta planta, presentaron actividad antimicrobiana contra la cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* y la levadura *Candida albicans* por el método de

dilución en caldo. En el año 2014 en el medio Oriente, Safari *et al.*, se enfocó en el uso de extractos de plantas en contra de aislados nosocomiales utilizando el método de difusión en agar; obteniendo que los extractos acuosos de *Arum maculatum*, *Allium hirtifolium* y *Teucrium polium* presentaron inhibición en el crecimiento de *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *S. aureus*, *P. acne* y *E.coli* en concentraciones de 2 a 5 µg/ml, resaltando que solo *Arum maculatum* presentó efecto sobre *A. baumannii*. Por otro en Latinoamérica en el año 2012 Montenegro *et al.*, preparó extractos con acetato de etilo y aceites esenciales de *Laurelia sempervirens*, para evaluar su efecto contra aislados nosocomiales utilizando el método de difusión en agar en contra de las cepas *Salmonella sp.*, *A. baumannii*, *P aeruginosa*, *S. marcescens*, *B. subtilis* y *S. aureus* utilizando concentraciones de 0.72 a 7200 µg/ml para el extracto obtenido con acetato de etilo y diluciones 1/1000 de los aceites esenciales, todas las bacterias presentaron inhibición en su crecimiento, resaltando que *A. baumannii* fue el más afectado. A los extractos crudos obtenidos por maceración, se les evaluó de manera cualitativa su actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar, para aquellos que presentaron inhibición en contra de los tres microorganismos en estudio, se prepararon concentraciones para determinar la cantidad de extracto que se necesita para inhibirlos.

Los resultados de Safari *et al.*, (2014) y Montenegro *et al.*, (2012) representan las CMI de sus extractos, asimismo se obtuvieron dichas concentraciones en este trabajo; para *A. canescens* de 5.2 a 13.7 mg/ml y para *P. laevigata* de 0.7 a 10.2 mg/ml, el microorganismo más afectado fue *S. aureus*. La obtención de la CMI no se llevó a cabo por el método de difusión del pozo en agar, si no por microdilución, técnica descrita anteriormente. Luber *et al.*, (2003) realizó una comparación entre diferentes técnicas de dilución y demostró que la microdilución posee alta sensibilidad, es específica y fácil de reproducir; la modificación realizada a la técnica esta basa en la utilización de un extracto en lugar de un antibiótico.

Modarresi *et al.*, (2012) evaluó la actividad antimicrobiana de varios extractos de *Urtica dioica*, determinó la CMI de cada uno de ellos por el método de dilución,

enseguida tomó un volumen de aquellos tubos que no presentaban crecimiento aparente y sembró en cajas de agar para verificar si existía o no crecimiento bacteriano, determinando así la concentración mínima bactericida (CMB). La obtención de la CMB para los microorganismos en estudio fue similar pero se llevó a cabo una variación en la técnica; la siembra fue por goteo y no por extensión en agar como se hace de manera convencional. La técnica de siembra por goteo (o conteo variable en superficie) fue descrita por Miles y Misra (1938) consiste en sembrar un volumen (gotas) de las diluciones o no diluciones de una bacteria en estudio y observar las UFC que crecen sobre la placa de agar. De esta manera fue como se obtuvieron las CMB; para *A. canescens* de 4.6 a 12.7 mg/ml y para *P. laevigata* de 0.17 a 9.2 mg/ml, el microorganismo más afectado fue *S. aureus*.

Al conocer las CMB de los extractos utilizados, se pudieron calcular las concentraciones subletales correspondientes al 25, 50, 75 %. Al evaluar el efecto de estas concentraciones; pero podemos observar que, *A. baumannii* no sufre alguna alteración en el crecimiento, *S. aureus* al 75 y 50% se altera su crecimiento considerablemente y para *P. aeruginosa* no existe efecto significativo. Estas evaluaciones permiten demostrar si el uso continuo de concentraciones subóptimas pueden provocar la aparición de resistencia (McMahon et al., 2007). La información obtenida se utilizará en futuras investigaciones. Un dato importante recabado en esta sección del trabajo fue, el valor exponencial de 10^9 UFC/ml (0% de extracto) de los tres microorganismos en estudio a las 18 h de crecimiento, ya que esta cantidad de bacterias se utilizaron a lo largo del trabajo. De igual manera se demostró que el solvente en el que están disueltos los extractos no afecta el crecimiento; Wadhwani *et al.*, (2008) evaluó los solventes DMSO, EtOH y MeOH en contra de *S. epidermidis*, *P. oleovorans*, *V. cholerae*, *S. flexneri* y *S. paratyphi A*, en concentraciones del 1 al 6 %, y observó que a partir del 4 % existe cambio significativo en el crecimiento. Por ello el autor nos explica que, si una prueba biológica se va a realizar, se debe tener cuidado de que el disolvente que proporciona mayor solubilidad sea compatible con el sistema. Disolventes no acuosos pueden resultar tóxicos para los organismos de ensayo. Las evaluaciones para determinar la concentración de disolvente causa toxicidad, siempre

deben llevarse a cabo antes del experimento y los controles también deben ser incorporados.

Desde 1982 (Meyer *et al.*), se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de la citotoxicidad con la utilización de "camarones de mar" (*Artemia salina*), el cual es utilizado para el tamizaje toxicológico de extractos. La toxicidad en vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos; por tal razón, en este trabajo se decidió realizar el bioensayo de letalidad sobre nauplios de *A. salina*. Este organismo es fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos; y genera resultados confiables siendo una alternativa poco costosa, sencilla y rápida. Puede ser usada de manera rutinaria en la investigación fitoquímica y permite crear una base para avanzar en posteriores estudios, que brinden aplicaciones (Forero, 2002). El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina*, para determinar valores de dosis letal 50 (DL₅₀), expresada en ppm (Martínez y Beltrán, 1999). Sin embargo, los valores obtenidos de DL₅₀, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas.

Los resultados obtenidos muestran que la DL₅₀ de *A. canescens* es 858 ppm (ligeramente tóxico) y para *P. laevigata* es de 449 ppm (moderadamente tóxico); el índice de toxicidad de la DL₅₀ varía en sus clasificaciones entre los autores Valdés *et al.* (2003), Sánchez *et al.* (2005) y Fernández *et al.* (2009) pero es muy semejante. Se tomó la clasificación de Sánchez *et al.* (2005), por ser la más detallada, siendo esta; 1-10 ppm extremadamente tóxico, 10-100 ppm altamente tóxico, 100-500 ppm moderadamente tóxico, 500-1000 ligeramente tóxico, 1000-15000 prácticamente no tóxico y > 1500 ppm relativamente inocuo.

La evaluación preliminar fitoquímica (pruebas químicas) del extracto de *A. canescens* demostró la presencia de cumarinas, sesquiterpelactonas, quinonas, taninos, carbohidratos y flavonoides. Mellado *et al.* (2012) realizó un análisis químico para *A.*

canescens determinando la cantidad de proteína, fibra, concentraciones de sodio, concentraciones de potasio y los taninos hidrolizables; esto debido a que en 2003 (Zanat *et al.*) ya se estudiaba la presencia de taninos en otras especies del género *Atriplex*. Dicha planta forma parte de la dieta en cabras y ovejas, esta se ubica en parte de México y Estados Unidos, por ello se han realizado estudios sobre el consumo de sus especies (Mellado *et al.*, 2012 y Urrutia *et al.*, 2014). Los taninos son compuestos polifenólicos que se encuentran en muchas plantas dicotiledóneas, especialmente en leguminosas forrajeras de regiones templadas y tropicales. Son empleados por las plantas como mecanismo de defensa contra herbívoros y patógenos y para la conservación del nitrógeno. La característica principal de los taninos es su capacidad para formar complejos reversibles con las proteínas. Existen dos grupos principales de taninos: hidrolizables y condensados, los cuales pueden tener efectos tóxicos o antinutricionales o benéficos en animales, dependiendo de su concentración en las plantas (Márquez y Suárez, 2008). Esto explica la importancia que poseen las plantas de uso forrajero y su utilidad. Asimismo de este género se han aislado glucósidos de flavonoides sulfatados de *Atriplex hortensis* por Bylka *et al.* (2001) y Tawfik *et al.* (2011) aisló e identificó cumarinas en *Atriplex semibacata*.

La evaluación preliminar del extracto de *P. laevigata* demostró la presencia de esteroides, cumarinas, alcaloides, taninos, carbohidratos y flavonoides. *Prosopis* spp. es un árbol que fija el nitrógeno, alcanzando alturas entre 5 a 10 m de alto, y hay alrededor de 44 especies diferentes en el mundo, y 10 de ellos en México (Rzedowski, 1988). En las hojas de *Prosopis juliflora* se encuentran los alcaloides julifloridina y juliprosopina, el indol-alcaloide triptamina, y el sesquiterpeno prosopidiona. De la corteza del tallo se han aislado los flavonoides 8-hidroxi-4'-metoxi-7-neohesperidósido de iso-flavona, 4 metil-éter-beta-galactopiranosido de camferol, alfa-ramnósido de leucodelfinidín y el glucosil-ramnósido y ombuín. Del fruto se han aislado los flavonoides camferol, glucopiranosido de leucocianidín y glucopiranosil-ramnopiranosido de delfinidín; y la cumarina pentaglicósilada del ácido dimetil-elágico. En la raíz se han detectado los flavonoides galactopiranosidos de 3'-4'-dihidroxi-5-metoxi-6-metil-flavonona y 4-7-dimetoxi-6-8-metil-flavonona. En la planta se han detectado los alcaloides de

indolizidina juliprosina y el iso-componente. En la semilla la cumarina 4-ramnosil-gentiobiósido del ácido elágico (UNAM, 2009). Las determinaciones químicas en diferentes partes de la planta *Prosopis juliflora* nos indican la presencia alcaloides, sesquiterpenos, flavonoides y cumarina; compuestos que se encuentran en el extracto de *P. laevigata* obtenido para este trabajo.

La extracción tipo Soxhlet con reflujo nos permitió separar los compuestos de las dos plantas, cuyos extractos preliminares utilizados presentaron actividad antimicrobiana; esto con ayuda de un gradiente de polaridad. Se utilizó Hexano, Cloroformo y Metanol en ese orden de extracción, de menor a mayor polaridad. Sus rendimientos fueron diferentes, pero para ambas plantas los extractos metanólicos presentaron mayor rendimiento; Luque de Castro & García-Ayudo (1994) y Romdhane (2002) nos explican que, esto se debe porque al aumentar la polaridad se aumenta la eficiencia de extracción.

Los extractos obtenidos del equipo Soxhlet fueron evaluados para ubicar en cual grupos de compuestos se encontraba la actividad antimicrobiana. Para ambas plantas fue el extracto metanólico. Gran parte de la información disponible con respecto a la inhibición de microorganismos con plantas (o partes de estas), seleccionan al metanol y/o etanol para llevar a cabo sus evaluaciones, Brewster (1978) explicó que el metanol y el etanol tienen una polaridad parecida (alta), extraen un rango de compuestos similares. Por ello Leyva *et al.* (2013) preparó extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii* para probar su actividad antimicrobiana y antioxidante, Quintana *et al.* (2010) preparó extractos metanólico de *Datura stramonium* para el control *in vitro* e *in vivo* de *Ramularia cercosporelloides*. Sin olvidar que Pandey & Tripathi (2014) definen al metanol como el mejor compuesto para llevar a cabo una extracción en material vegetal.

Choma & Grzelak (2010) nos explican que la bioautografía es un método sencillo y rápido que combina las ventajas de la cromatografía en capa fina y la detección de actividad antimicrobiana, logrando visualizar directamente la(s) fracción(es) con actividad antimicrobiana. Así mismo nos señalan que es importante el

saber o no la presencia del analito buscado, la economía y equipos para la realización de la prueba. El método puede ser usado para determinar diferentes actividades biológicas por ejemplo; antimicrobiano, antifúngico, antitumoral y antiparasitario. Para los extractos metanólicos obtenidos con Soxhlet de *A. canescens* y *P. laevigata* se buscó el efecto antimicrobiano en la separación de sus compuestos. Existen metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de un extracto o de una fracción de este (Choma & Grzelak, 2010); la primera de ellas es la difusión, la segunda es el uso de dilución, y finalmente la autobiografía, de esta puede ser por inmersión o por contacto. Nosotros llevamos a cabo la bioautografía de contacto. El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de cromatografía en capa fina, seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es evaluada por inmersión o contacto, esto nos ayuda a identificar el compuesto (banda en la placa) con la actividad biológica sobre el microorganismo en estudio, se podría decir que este es un ensayo preliminar para la identificación y purificación de dicha sustancia (Suleiman *et al.*, 2010). Para ambos extractos se probaron diferentes gradientes de solventes hasta obtener la mejor separación, siendo para *A. canescens* 2:2:1 Metanol: Acetato de Etilo: Hexano y para *P. laevigata* 7:3 Cloroformo: Metanol. La inhibición observada en ambos extractos nos permitió conocer la polaridad de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, no polar para *A. canescens* y medianamente polar para *P. laevigata*.

Para la purificación de los compuestos con actividad antimicrobiana se llevó a cabo una cromatografía en columna para los dos extractos metanólicos, se eluyeron los solventes Cloroformo y Metanol en un gradiente polar y se fueron recolectando fracciones como ya se explicó anteriormente; en seguida fueron comparadas por TLC y aquellas fracciones similares fueron mezcladas; Ibarra *et al.* (2011), Ríos *et al.* (2006), Shaker y Seifert (2003), Matloub *et al.* (2014) y Singh (2012) utilizaron la cromatografía en columna para extraer alcaloides de *Erythrina americana*, metabolitos secundarios de las hojas de *Hamelia patens*, saponinas triterpenoides de *Atriplex semibacata*, la fracción lipídica de *Atriplex lindleyi* y para aislar e identificar moléculas de las hojas de *Prosopis juliflora* respectivamente. Todos ellos utilizaron diferentes solventes, pero el uso de un

ingrediente polar está presente en todas esas investigaciones, también el comparar las fracciones obtenidas de la elución para después mezclar aquellas que se asemejan.

Vivot y Cruanes (2008) evaluaron la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de *Polygonum punctatum* y *Arctium minus*. De igual manera Seanego y Ndip (2012) probaron las actividad antimicrobiana de las fracciones con actividad biológica de *Garcinia kola*. En este estudio se obtuvieron dos y cuatro fracciones con actividad de *A. canescens* y *P. laevigata* respectivamente. Las fracciones con actividad antimicrobiana de *P. laevigata* se unieron, resultado solo una fracción de 480 mg aproximadamente; se evaluó con los reactivos de Marquis y Dragendorff, obteniéndose resultados positivos; debido a que en 2011 (Singh *et al.*) se llevó a cabo un estudio de la actividad antimicrobiana de varias parte de *Prosopis juliflora* y se demostró que aquellas que presentaban inhibición eran ricas en alcaloides; se identificaron a juliprosopina, juliprosina, juliprosinina, julifloridina, projulina y prosafrinina. En 2012 (Zamacona y Castro) en un estudio preliminar, por medio de pruebas químicas se demostró la presencia de alcaloides en *Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida* en el estado de Guanajuato utilizando los mismos reactivos. Para el 2011 (Samoylenko *et al.*) se aisló un nuevo alcaloide de *Prosopis glandulosa*, llamado indolizidina; con un gran poder antimicrobiano y antiparasitario. Y en 2013 (Dos Santos *et al.*) evaluó la actividad antimicrobiana del extracto rico en alcaloides del fruto de *Prosopis juliflora* y su influencia en la digestión en rumiantes *in vitro*. Por todo lo anterior, se decidió obtener tan sólo una fracción rica en alcaloides con actividad antimicrobiana en el presente estudio, los resultados obtenidos serán utilizados en futuras investigaciones. Cabe mencionar que parte de estos datos fueron compartidos con la Asociación Civil S.O.S. Mezquitera La Pona del estado de Aguascalientes para evitar la tala y deforestación del mezquite en dicho estado.

Tawfik *et al.* (2011) realizó estudios fitoquímicos y biológicos en *Atriplex semibacata*; obtuvo diferentes extractos utilizando éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol, todos ellos fueron evaluados y presentaron actividad antimicrobiana. Por ello a las dos fracciones con actividad antimicrobiana de *Atriplex*

canescens se les comparó por TLC y se observó que ambas presentaban cierta similitud, una banda con las siguientes características; reaccionaba a la luz UV ($\lambda = 365$ nm) emitiendo un color azul brillante, con un Rf de 0.58 (Benceno: Acetona 7:3) y al recibir tratamiento químico se volvía amarilla. Tawfik et al. (2011) aisló e identificó del extracto de cloroformo y acetato de etilo las siguientes cumarinas; escopaletina, umbeliferona, cumarina, escopolina 7-metoxi cumarina y al ácido p-cumarico utilizando cromatografía en papel y espectroscopia de masas, también nos menciona que la umbeliferona, cumarina, escopolina 7-metoxi cumarina y el ácido p-cumarico emiten un color azul brillante bajo la luz UV. Enseguida las fracciones de *Atriplex canescens* fueron mezcladas para aumentar la concentración de ese compuesto. Se realizó una bioautografía obteniendo inhibición en la banda antes mencionada.

Al ubicar el compuesto responsable se procedió a separarlo por PLC siendo este; un medio eficaz y fácil de obtener pequeñas cantidades de compuestos a partir de mezclas naturales, que luego se pueden utilizar para diferentes propósitos, por ejemplo la determinación de la estructura de los compuestos aislados, por métodos espectroscópicos o la investigación de su actividad biológica (Waksmundzka, 2006). Por ejemplo Józwiakand y Waksmundzka (2007) utilizaron esta técnica para separar alcaloides de *Fumaria officinali*, remarcando en esta investigación la concentración de la muestra que se debe aplicar en la base de la placa cromatográfica para obtener una buena separación de los compuestos. Gutiérrez *et al.* (2009) utilizó la capa fina preparativa para separar los esteroides obtenidos de una cromatografía en columna y así mismo para verificar su pureza por HPLC al compararlo contra estándares.

Para una determinación cualitativa y/o cuantitativa de cualquier analito mediante HPLC, es esencial una adecuada separación de éste con otros interferentes propios de la muestra, para esto, es necesario estudiar todas las variables propias del método cromatográfico, tales como velocidad de flujo de los solventes, composición de la fase móvil y temperatura, entre otros (Oliveros *et al.*, 2010). Por ello se utilizaron diferentes características en el equipo para obtener un mejor resultado; al suponer de la presencia de una cumarina en la banda activa se procedió con una fase móvil (Acetonitrilo:

Metanol 50:50) y un flujo en la columna (isocrático a 1 ml/min) muy similar a la utilizado por Oliveiros *et al.*, (2010) siendo estos; fase móvil Acetonitrilo: Agua (45:50) y un flujo en la columna isocrático a 1 ml/min. Tawfik *et al.* (2011) determinó que las cumarinas aisladas de *Atriplex semibacata* reaccionan en un rango de 200 a 350 nm, por ello se llevaron a cabo pruebas entre 200 y 400 nm para la banda activa de *Atriplex canescens* en el equipo utilizado. La mejor respuesta de los compuestos se observa a una $\lambda=220$ nm, podemos apreciar que la fase móvil posee un tiempo de retención en el 2 min y la banda activa de 3.2 min. Se pueden observar impurezas en ambos cromatogramas, pero esto se debe a la fase móvil utilizada. Ya que al inyectar sólo la fase móvil estos picos aparecían pero no el del minuto 3.2.

Después de verificar la pureza de la banda activa y para afirmar que se trataba de una cumarina se llevaron a cabo las pruebas químicas mencionadas anteriormente. Se obtuvo un resultado positivo a cumarina y carbohidratos; a pesar de lo observado en los cromatogramas, no se aprecia un segundo pico con las condiciones mencionadas. Karkacier (2003) nos menciona que esto se puede deber al hecho de que los azúcares absorben luz UV en el rango de longitud de onda de 190-210 nm y se necesita una fase móvil adecuada para su separación siendo esta Acetonitrilo: Agua (75:25) .

Wagner & Bladt (2003); nos proporcionan una enorme gama de separaciones e identificaciones con la ayuda de fases móviles y reveladores específicos para metabolitos secundarios en plantas, siendo apoyados por sus respectivos factores de retención, para cada una de las bandas de manera más exacta sin recurrir a otros métodos más caros y sofisticados. Por ello se evaluó a la cumarina contra estándares proporcionados por dichos autores como ya se ha mencionado anteriormente. De las cumarinas aisladas por Tawfik *et al.* (2011) sólo dos se encuentran en los estándares mencionados por Wagner & Bladt (2003), siendo estas la escopaletina (R_f 0.271), umbeliferona (0.385). La cumarina identificada de *Atriplex canescens* mostró un R_f de 0.482. Los R_f 's más aproximados a la muestra analizada serían la xantotoxina (0.557) y la oxypeucedanina (0.528), ambas pertenecientes al grupo de las furanocumarinas; dicho tipo de compuestos son de origen vegetal y de alto interés farmacéutico, capaces de

interaccionar con la radiación ultravioleta produciendo un efecto fotosensibilizante sobre las células. Son usadas en el tratamiento de varias enfermedades de la piel como la psoriasis, el vitíligo y el linfoma T cutáneo; además, se usan como protectores solares en preparaciones cosméticas. Numerosos estudios reportan la incidencia de estas sustancias naturales en procesos vitales para el hombre como la mutagenicidad, la carcinogenicidad y la inhibición de tumores (Jiménez, 2013).

Del compuesto semipurificado de *A. canescens* se obtuvo una cantidad aproximada de 25 mg (raspado de la banda en PLC) de un total de 7 g colocados en la columna cromatográfica. Tawfik et al. (2011) obtuvo una cantidad de 20 mg aproximadamente de cada una de las cumarinas aisladas de *Atriplex semibacata* de un total de 1.8 Kg de planta utilizada, pero debemos mencionar que realizó un extracto crudo con éter de petróleo y posteriormente realizó un fraccionamiento usando diferentes solventes. La evaluación antimicrobiana en contra de *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* que dicho autor realizó fue con los extractos y no con los compuestos aislados; por ello se llevó a cabo una evaluación de la actividad antimicrobiana con el compuesto semipurificado obtenido de *A. canescens* obteniendo que, 67.5 µg inhibieron a *S. aureus*, 112.5 µg no afectaron a *A. baumannii* y 157.5 µg afectaron el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Cabe mencionar que Tawfik et al. (2011) a pesar de trabajar con 7 veces más de material vegetal obtuvo muy poca cantidad de las cumarinas aisladas y un dato aún más importante es que las cumarinas extraídas por dicho autor provienen solo de dos extractos *Atriplex semibacata*; de aquel obtenido con cloroformo fueron cuatro cumarinas y con acetato de etilo fueron dos cumarinas. Por ello la concentración de cumarinas evaluadas fue mucho mayor a la utilizada en los ensayos finales del compuesto semipurificado de *Atriplex canescens*. Por ejemplo Martínez et al. (2012) determinó cumarinas en un extracto de hojas de *Anacardium occidentale* con actividad antimicrobiana esto para remarcar el uso de extractos y no compuestos purificados en la evaluación antimicrobiana. Pero en años recientes Torres et al. (2014) y Soto et al.

(2014) han aislado y probado el efecto de actividad antimicrobiana de los compuestos de *Hylocereus* sp. y el efecto antiinflamatorios de los compuestos de *Stenocereus* sp. respectivamente. Por lo anterior se puede decir que no sólo basta el uso del extracto o una parte de este para su evaluación biológica, ya que lo ideal es determinar el compuesto o conjunto de compuestos que están causando el efecto deseado.

Leseva *et al.* (2013) durante los años 2007 al 2011 en una clínica de Bulgaria encontró que los aislados más frecuentes eran *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*; en 2014 (Pérez *et al.*) se demostró la presencia de las misma cepas en Cuba en los aislados nosocomiales. Asimismo en 2014 (Rodríguez *et al.*) realizó una búsqueda exhaustiva sobre la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias en México; es lo que más preocupa a los médicos responsables del diagnóstico y tratamiento de una infección es la llamada resistencia adquirida, la cual ocurre en una bacteria inicialmente sensible a los antibióticos por cambios, por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia durante el fenómeno conocido como transferencia genética lateral, que es un proceso por medio del cual un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente. La resistencia bacteriana adquirida a los antibióticos puede ser de distintos tipos, dependiendo de la presión selectiva, las mutaciones o la transferencia de genes de resistencia. Los tres microorganismos fueron seleccionados por su tasa de aislamiento en hospital universitario Dr. José Eleuterio González en Nuevo León, México como se había mencionado anteriormente (Llaca *et al.*, 2013). Una serie de antibiogramas fueron realizados a los microorganismos utilizados en este estudio, esto nos permitió conocer la farmacorresistencia que poseen cada una de ellos; para *S. aureus* 8 de 12 antibióticos mostraron sensibilidad, para *P. aeruginosa* 4 de 12 antibióticos mostraron sensibilidad y para *A. baumannii* sólo 1 de 19.

Las comparaciones con el trabajo de Llaca *et al.* (2013) nos muestran que para *S. aureus* tres de los cuatro antibióticos que presentaron resistencia, poseen alta frecuencia en los aislados por dicho autor siendo la ampicilina (90% de los aislados), cefepime (63.6% de los aislados), penicilina (89.3 % de los aislados) y la gentamicina sin determinar por el autor. Los antibióticos a los cuales fue sensible fueron; cefalotina,

cefatoxima, cefuroxima, dicloxacilina, eritromicina, levofloxacina, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol.

Para *P. aeruginosa*, 3 de 8 antibióticos que presentaron resistencia fueron evaluados por el autor, siendo cefatoxima (31.5 % de los aislados), cloranfenicol (94.5% de los aislados) y gentamicina (21.5% de los aislados), los otros cinco que presentaron resistencia fueron ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, nitrofurantoína y trimetoprima/sulfametoxazol. Los antibióticos a los cuales fue sensible fueron; amikacina, cefepime, levofloxacina y netilmicina.

Y finalmente para *A. baumannii*, 8 de 14 antibióticos que presentaron resistencia fueron evaluados por el autor, siendo amikacina (74.5 % de los aislados), cefepime (23.2% de los aislados), cefotaxima (86.1% de los aislados), ceftazimida (85% de los aislados), ceftriaxona (85.8 % de los aislados), ciprofloxacino (85.5 % de los aislados), gentamicina (83.2 % de los aislados), levofloxacina (81.6% de los aislados) y trimetoprima/sulfametoxazol (86.9 % de los aislados), los otros cinco que presentaron resistencia fueron ampicilina, amoxicilina/clavulanato, cefalotina, clindamicina, cloranfenicol, netilmicina, nitrofurantoína y penicilina. El único antibiótico al cual fue sensible; el Imipenem pero Llaca *et al.* (2013) encontró que el 75.7% de los aislados de *A. baumannii* presentaron resistencia a dicho antibiótico.

9. CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos preliminares de *Atriplex canescens* (Cenizo) y *Prosopis laevigata* (Mezquite) presentaron actividad antimicrobiana contra las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* siendo el extracto de Mezquite el más activo con una CMB de 0.17 a 9.2 mg/ml.

Las concentraciones subletales (25, 50 y 75% de la CMB) de las dos plantas estudiadas redujeron significativamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en los bioensayos del 75 y 50 %.

La toxicidad de los extractos metanólicos *A. canescens* y *P. laevigata* fueron 858 ppm ligeramente tóxico y 449 ppm moderadamente tóxico respectivamente.

Se logró el aislamiento y la semipurificación de compuestos de *A. canescens* y *P. laevigata* por un ensayo bio-dirigido, los cuales fueron caracterizados como como una cumarina y una fracción alcoloidea respectivamente, ambos con actividad antimicrobiana.

De los tres microorganismos nosocomiales evaluados; *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, el que presentó mayor resistencia a los antibióticos fue *Acinetobacter baumannii* al mostrar sensibilidad a 1 de 19 antibióticos.

10. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos durante esta investigación se confirma que los extractos metanólicos del cenizo, falso ajo y mezquite son una fuente de compuestos bioactivos los cuales, pueden considerarse como alternativas para el tratamiento de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo dichas plantas podrían ser utilizadas para el control del resto de microorganismos pertenecientes al grupo ESKAPE. Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para proveer información acerca de los compuestos responsables de inhibición de los ya mencionados microorganismos nosocomiales.

Al encontrar aquellos metabolitos de interés, se tiene la idea de que al ser compuestos de origen natural provenientes de plantas, tendrán como ventaja el poseer baja toxicidad, por ello se necesitan futuros ensayos de citotoxicidad para asegurar la inocuidad de dichos compuestos.

Aquellos compuestos aislados que no muestren toxicidad podrían ser evaluados en otros sitios blanco sobre los microorganismos como la adhesión bacteriana y/o la formación de biopelículas ya que al tratar de inhibir su crecimiento se podría generar una presión selectiva como ya lo hacen los antibióticos. Por ello se debe considerar el uso de las concentraciones subletales de aquellos compuestos que inhiban el crecimiento. Pero sería interesante no solo obtener de manera cualitativa si un compuesto o no puede afectar los mencionados factores de virulencia; si no, poder observar si a nivel molecular existe algún cambio significativo. Con dichos resultados se podrían realizar más investigaciones no sólo con microorganismos nosocomiales, si no con cualquier tipo de bacteria, hongos, parásitos o virus.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Amábile-Cuevas CF. 2010. Global perspectives of the resistance problem. Antimicrobial resistance in developing countries. New York: Springer. pp 3-13.
2. Amábile-Cuevas CF, Cabrera R, Fuchs LY & Valenzuela F. 1998. Antibiotic resistance and prescription practices in developing countries. Meth Microbiol 27: 587-594.
3. Modarresi-Chahardehi A, Ibrahim D, Sulaiman SF & Mousavi L. 2012. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica.*, Rev. Biol. Trop. 60(4): 1567-1576.
4. Arreguín R, González R y De la Torre A. 2012. Infecciones adquiridas en los hospitales ¿Cuánto cuestan y como se calcula?. Revista Digital Universitaria. 13(9):1-10.
5. Beaber J, Hochhut B & Waldor MK. 2003. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature 427: 72-74.
6. Beceiro A, Tomás M y Bou G. 2012. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano?. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 30(8):492-499.
7. Bhardwaj S, Bhamre K, Dhawale J, Patil M. & Divase M. 2013. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, the nosocomial pathogens with special reference to multi-drug resistance and phenotypic characterization. International Journal of Pharmaceutical Science and Practice. 2(1):1-10.

8. Brewster R. 1978. Curso de química orgánica experimental. Ed. Alhambra. México. p 43.
9. Boban N, Jeroncic A. & Punda-Polic V. 2011. Outbreak of nosocomial bacteremias, caused by *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter aerogenes*, in the neonatal intensive care unit, case - control study. *Signa Vitae*. 6(1):27-32.
10. Boutouba A, Holechek J, Galyean M, Núñez-Hernandez G, Wallace J & Cardenas M. 1990. Influence of two native shrubs on goat nitrogen status. *Journal of Range Management* 43(6):530-534.
11. Bylka W, Stobiecki M & Frański R. 2001 Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(3):285.
12. Camacho G. 2013. Programas de uso prudente de antibióticos en los hospitales: una estrategia efectiva para disminuir la resistencia a los antimicrobianos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 26(104): 282.
13. Carrillo M, Castillo L y Mauricio R. 2011. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Inf. tecnol*. 22(5):718-764.
14. Chen Y, Chou C & Chou P. 2005. Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 26(3):281-287.
15. Choma I & Grzelak E. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1218(19):1-8.

16. Chowdhury A, Ashrafuzzaman M, Hazrat A, Nahar L & Ali Zinnah M. 2013. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Multi Drug Resistant Human Pathogens. *Infinity*. 1(1):1-24.
17. Das K, Tiwari R, & Shrivastava D. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J. Med. Plant. Res.* 4(2):104-111.
18. Decré D, Verdet C, Emirian A, Le Gourrierc T, Petit JC, Offenstadt G, Maury E, Brisse S & Arlet G. 2011. Emerging Severe and Fatal Infections Due to *Klebsiella pneumoniae* in Two University Hospitals in France. *Journal of Microbiology Clinical*. 49(8): 3011-3014.
19. Díaz V. 2010. *Acinetobacter baumannii*: actualidades. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 23(92):104-105.
20. Djeussi D, Noumedem J, Seukep J, Fankam A, Voukeng I, Tankeo S, Nkuete A & Kuete V. 2013. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13(164):1-8.
21. Dos Santos E, Pereira M, da Silva C, Souza-Neta L, Geris R, Martins D, Santana A, Barbosa L, Silva H, Freitas G, Figueiredo M, de Oliveira F, Batista R. 2013. Antibacterial Activity of the Alkaloid-Enriched Extract from *Prosopis juliflora* Pods and Its Influence on in Vitro Ruminant Digestion. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:8496-8516.
22. Domínguez, X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa. México. pp 40-43.

23. Dreser A, Wirtz VJ, Corbett KK y Echániz G. 2008. Uso de antibióticos en México. *Salud Pública*. 50(4): 480-487.
24. Echeverri L y Cataño J. 2010. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y Resistencia. *IATREIA* 23(3):240-249.
25. Safari E, Amiri M, Bahador A, Amiri M & Esmaili D. 2014. The study of antibacterial effects of alcoholic extracts of *Arum maculatum*, *Allium hirtifolium* and *Teucrium polium* against nosocomial resistance bacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(2):601-605.
26. Farnsworth NR, Soejarto DD. 1991: *Global Importance of Medicinal Plants. The Conservation of Medicinal Plants* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. pp 25-51.
27. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Narimani T, Arabestani M & Ghoddousi A. 2012. *Journal of Research in Medical Sciences*. 17(4):332-337.
28. Fernández-Calienes V Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, Scull R y Gutiérrez Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*. 61(3): 254-258.
29. Fierro L. 1991. Utilización de *Atriplex canescens* y su importancia en la dieta del ganado y su manejo. En: Memoria del Taller sobre captación y aprovechamiento del agua con fines agropecuarios en zonas de escasa precipitación. INIFAP, SARH. pp: 255-270.
30. Forero GA. 2002. Estudio Fotoquímico del extracto etanólico de la madera de "Virola carinata" (Myristicaceae). Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.

31. Girard R, Perraud M, Pruss A, Savey A, Tikhomirov E, Thuriaux M. & Vanhems P. 2003. Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía práctica. OMS 2):1-71.
32. Grimont F & Grimont P. 2006. The Genus *Enterobacter*. Prokaryotes 6:198-202.
33. Gómez L, Galar M, Téllez L, Ana Ma.; Carmona F y Amaya A. 2009. Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 40(1):5.
34. Gutiérrez J, Montaña K, Bracho J, Rodríguez C y Chang A. 2009. Caracterización de esteroides en la fracción lipídica de la maca (walp.) mediante técnicas cromatográficas. Rev Soc Quím Perú. 75(2):254.
35. Hernández G, Cabrera G, Fernández M, González F, Silva M, Caldera J y Pitteloud J. 2010. Frecuencia y resistencia bacteriana de *Staphylococcus aureus* en infecciones nosocomiales en el Hospital Universitario de Caracas, años 2004 y 2007. Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana. 15(1):28.
36. Ibarra E, Pacheco M, García R, San Miguel R, Ramírez G y Soto M. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. Rev. fitotec. mex. 34(4):241-246.
37. Jamil M, Haq I, Mirza B & Qayyum M. 2012. Isolation of antibacterial compounds from *Quercus dilatata* L. through bioassay guided fractionation. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 11:1-11.
38. Japoni A, Sofian M, Van Belkum A. & Ghaznavi E. 2013. Nosocomial Outbreak of Extensively and Pan Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Tertiary Hospital in Central Part of Iran. Jundishapur J Microbiol. 6(8):1-5.

39. Jiménez A. 2013. Furanocumarinas y su aplicación en fotoquimioterapia. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, ISSN-e 2173-0903. No. 10.
40. Jones RN, Fritsche TR & Moet GJ. 2008. In vitro potency evaluations of various piperacillin/tazobactam generic products compared with the contemporary brand (Zosyn, Wyeth) formulation. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61:76-79.
41. Józwiakand GW, Waksmundzka-Hajnos M. 2007. Preparative-layer chromatography of an extract of alkaloids from *Fumaria officinalis*. *Acta chromatographica*. No. 18.
42. Kumarasamy Y, Cadwgan T, Gillanders IA, Jappy B, Laing R & Gould IM. 2003. Optimizing antibiotic therapy -the Aberdeen experience. *Clin Microbiol Infect* 9:406-411.
43. Leseva M, Arguirova M, Nashev D, Zamfirova E & Hadzhyiski O. 2013. Nosocomial infections in burn patients: etiology, antimicrobial resistance, means to control *Annal Burns Fire Disasters*. 26(1): 5-11.
44. Leyva JM, Pérez-Carlón J y González-Aguilar GA. 2013. Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*. *Rev. Mex. Microbiología*. 37:11-17.
45. Llaca J, Mendoza S, Camacho A, Flores S. & Garza E. 2012. One-Year Surveillance of ESKAPE Pathogens in an Intensive Care Unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy*. 58:475 -481.

46. López C, Sanchez MG, Arrieta D y Roman JH. 2010. Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de *Salvia amarissima* Ort. Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar. 9:67–76.
47. Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J & Hahn H. 2003. Comparison of broth microdilution, *E*-test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol. 41:1062–1068
48. Luque de Castro MD. & Garcia-Ayuso LE. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. 369:1-10.
49. Mabry T. 1986. Fifty one flavonoids from *Gutierrezia microcephala*. *Phytochemistry (oxford)*: 927-934.
50. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME & Giske CG. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18:268-81.
51. Marcano, D. & M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica orgánica. UCV. Litopar, Caracas, Venezuela.
52. Martínez. C y Beltran M. 1999. Estudio fitotoxicológico preliminar de diez especies vegetales utilizadas en medicina natural. Tesis (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.

53. Martínez Y, Soto F, Almeida M, Hermsilla R y Martínez O. 2012. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Rev Cubana Plant Med.* 17(4):320-329.
54. Matloub AA, Hamed MA & Elsouda SS. 2014. Chemo-protective effect on hepato-renal toxicity and cytotoxic activity of lipoidal matter of *Atriplex lindleyi* moq. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(8).
55. McMahon SA, Blair SI, Moore EJ & McDowell AD. 2007. Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 59:125–127.
56. Mellado M, Rodríguez A, Lozano EA, Dueñez J, Aguilar CN & Arévalo JR 2012. The food habits of goats on rangelands with different amounts of fourwing saltbush (*Atriplex canescens*) cover. *Journal of Arid Environments* 84:91–96.
57. Meyer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Nichols DE. & McLaughlin JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica* 45(3):1-34.
58. Mila-Arango R, Ramírez-Bribiesca E, Soto-Hernández RM, Hernández-Mendo O, Torres-Hernández G y Mellado-Bosque MA. 2014. Identificación y estudio fitoquímico de dos especies de cazahuate en la intoxicación de cabras en una comunidad de la mixteca Oaxaqueña. *Agricultura, sociedad y desarrollo.* 11(4):463-479.
59. Miles A. & Misra S.S. 1938. *Journal of Hygiene* 38:732.

60. Montenegro I, Madrid A, Zaror L, R. Martinez, Werner E & Carrasco-Altamirano H. 2012. Antimicrobial activity of ethyl acetate extract and essential oil from bark of *Laurelia sempervirens* against multiresistant bacteria. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. 11:306-315.
61. Morales-Meza MG y Ruiz de Chávez-Ramos CG. 2006. Diferencias en la resistencia a los antimicrobianos de cepas *Staphylococcus aureus* obtenidas de diversas fuentes de aislamiento. Universidad La Salle. Rev. del Centro de Investigación. 25(7):45-64.
62. Karkacier M, Erbas M, Mustafa K & Aksu M. 2003. Comparison of different extraction and detection methods for sugars using amino-bonded phase HPLC. Journal of chromatographic science. 41(6):331-3.
63. Oliveros-Bastidas A, Cordero I, Paredes D, Buendía D y Macías F. 2010. Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólico de semillas de *Dipteryx odorata*. Rev. Latinoam. Quím. 39(1):17-31.
64. Paganelli F, Willems R, Jansen P, Hendrickx A, Zhang X, Bonten M & Leavis H. 2013. *Enterococcus faecium* Biofilm Formation: Identification of Major Autolysin AtlA_{Efm}, Associated Acm Surface Localization, and AtlA_{Efm}-Independent Extracellular DNA Release. mBio. 4(2):1-10.
65. Pandey A y Tripathi S. 2014. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. 2(5):115-119.
66. Parra G, Enriquez C y Ramírez M. 2002. Utilización de *Atriplex canescens* y *Atriplex nummularia* por cabras y borregos en la región costera de Sonora. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Puebla. p 75.

67. Ravishankar S, Zhu L, Law B, Joens L & Friedman M. 2008. Plant-derived compounds inactivate antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Food Protection*. 71(6):1145-1149.
68. Pérez FA, Martínez I, Rojas CA, Mato Y Pérez E. 2014. Infección nosocomial en unidades de cuidados intensivos. *Rev Cub Med Int Emerg*. 13(2):116-125
69. Rodríguez E, León G, Petersen S, Pérez H, González E y Morfín R. 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*. 34 (Supl.1).
70. Rodríguez MSE, Cervantes-Villagrana AR, Castañeda-Delgado JE, Presno-Bernal JM, Cervantes-Villagrana RD. 2014. Perfil de resistencia bacteriana en hemocultivos realizados en población mexicana en los años del 2009 al 2011. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 61(2):108-114.
71. Quintana-Obregon EA, Plascencia-Jatomea M, Burgos-Hernández A, Guerrero-Ruiz J, Parra-Vergara N, Cortez-Rocha M. 2010. Extracto metanólico de *Datura stramonium* para el control *in vitro* e *in vivo* de *Ramularia cercosporelloides*, agente causal de la falsa cenicilla del cártamo (*Carthamus tinctorius*). *Rev. Mex. Mic*. 31:19-27.
72. Robles J. 2003. Aislamiento de principios biológicamente activos presente en especies colombianas de la familia Burseraceae". (Colección de trabajos entre los años 2000 y 2003). Programa nacional de ciencias básicas. Técnico final.
73. Romdhane M. & Gourdou C. 2002. Investigation in solid-liquid extraction influence of ultrasound. *Chem. Eng. J*. 87:11-19.
74. Rice L. 2008. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *JID*. 197:1079-1081.

75. Rice L. 2010. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogen. *Infection control and hospital epidemiology*. 31(S1):7-10.
76. Rios MY y Aguilar-Guadarrama AB. 2006. Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). *Rev Cubana Plant Med*. 1(1).
77. Ruiz J, Ascacio J, Rodríguez R, Morales D. & Aguilar C. 2011. Phytochemical screening of extracts from some Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(13): 2791-2797
78. Rzedowski J. 1988. Análisis de la Distribución Geográfica del Complejo *Prosopis* (Leguminosae-Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*. 3:7-19
79. Salinas D, Arteaga G, León I, Dorado O, Valladares M & Navarro V. 2009. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra biosphere reserve in Morelos (Mexico). *Polibotánica*, 28:213-225.
80. Sánchez E, Heredia N. & García S. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20):6888-6894.
81. Sánchez L y Neira A. 2011. Bioensayo General de Letalidad en *Artemia Salina*, a Las Fracciones del Extracto Etanólico De *Psidium Guajava*. L y *Psidium Guineense*. *Sw Cultura Científica*. 0(3):40-45.

82. Sato M, Tsuchiya H, Takase I, Kureshiro H, Tanigaki S & Inuma M. 1995. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother Res* 9:509-512.
83. Shaker KH & Seifert K. 2003. Triterpenoid saponins from *Atriplex semibacata*. *Z Naturforsch* 58:485–489
84. Sava IG, Heikens E & Huebner J. 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical microbiology and infection*. 16:533–540.
85. Seanego CT & Ndip RN. 2012. Identification and Antibacterial Evaluation of Bioactive Compounds from *Garcinia kola* (Heckel) Seeds *Molecules* 2012, 17, 6569-6584
86. Samoylenko V, Ashfaq MK, Jacob MR, Tekwani BL, Khan SI, Manly SP, Joshi VC, Walker LA & Muhammad I. 2009. Indolizidine, Antiinfective and Antiparasitic Compounds from *Prosopis glandulosa* Torr. Var. *glandulosa*. *Journal of natural products*. 72(1):92-98.
87. Sibanda T. & Okoh A. 2007. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology*. 6(25):2886-2896.
88. Singh S, Swapnil, Verma S.K. 2011. Antibacterial properties of Alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora* *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. 2(3):114-120.
89. Singh S. 2012. Isolation and identification of pigment molecules from leaves of *Prosopis juliflora*. *RJP*. 3(4):151-152.

90. Sohn H, Son K, Kwon C, Kwon G & Kang S. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* 11:666-672.
91. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP & Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Médica*. 59:250-252.
92. Soto-Cabrera D, Torres-Olvera M; Salazar JR, Cerón-Nava A y Rosales-Guevara J. 2014. Actividad antiinflamatoria, antimicrobiana y antioxidante de extractos y compuestos aislados de *Stenocereus sp.* *Vitae*, 21(1):59-60.
93. Suleiman MM, McGaw LJ, Naidoo V & Eloff JN. 2010. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 7:64-78.
94. Tawfik WA, Abdel-Mohsen MM, Radwan HM, Habib AA & Yeramian MA. 2011. Phytochemical and biological investigations of *Atriplex semibacata* R.Br. growing in Egypt. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 8(4):435-43.
95. Torres-Olvera M, Salazar JR, Soto-Cabrera D, Cerón-Nava A y Rosales-Guevara J. 2014. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y compuestos aislados de *Hylocereus sp.* *Vitae*. 21(1):78-79.
96. Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, & Venkitanarayanan K. 2014. "Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis," *BioMed Research International*. pp: 1-18.

97. U.N.A.M. 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [Online] Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7712>
98. Urrutia-Morales J, Gámez-Vázquez HG, Beltrán-López S & Díaz-Gómez MO. 2014. Use of *Atriplex canescens* and *Opuntia ficus indica* as feed for lactating goats during drought. *Agronomía Mesoamericana*: 25(2):287-296.
99. Vahdani P, Yaghoubi T & Aminzadeh Z. 2011. Hospital Acquired Antibiotic-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Infections in a 400-Bed Hospital in Tehran, Iran. *International Journal of Preventive Medicine*. 2(3):127–130.
100. Valdés-Iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, Acevedo ME, Areces AJ y Graña L. 2003. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*. 16:36-45.
101. Vallés J. & Mariscal D. 2005. Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 23(3):30-36.
102. Vivot EP. y Cruanes MJ. 2008. Actividades antimicrobiana y antiviral de extractos vegetales de algunas especies de la flora de Entre Ríos. *Cienc. docencia tecnol*. 37:177-189.
103. Yamaki M, Kashihara M & Takagi S. 1990. Activity of Kushen compounds against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Phytother Re*. 4:235-236.
104. Wadhvani T, Desai K, Patel D, Lawani D, Bahaley P, Joshi P & Kothari V. 2008. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *The Internet Journal of Microbiology*. 7(1).

105. Waksmundzka-Hajnos M, Wawrzynowicz T, Hajnos ML, & Józwiak GW. In: T. Kowalska and J. Sherma (Eds). 2006. Chromatographic Science Series, Preparative Layer Chromatography. Taylor and Francis. New York. Vol. 95. p 251.
106. Zamacona XD y Castro E. 2010. Identificación y obtención de alcaloides en variedades de mezquite (*Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida*). Verano de la ciencia. Universidad Autónoma de Guanajuato. Revisado en línea.
107. Zanat-Abu MM, Al-Hassanat FM, Alawi M & Ruyle G.B. 2003. Oxalate and tannins assessment in *Atriplex halimus* L. and *A. nummularia* L. Journal of Range Management 58:370-374.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

David Alejandro Hernández Marín

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
CONTRA MICROORGANISMOS FARMACORRESISTENTES DEL GRUPO
ESKAPE

Campo de estudio: Salud y enfermedades importantes de la sociedad mexicana.

Datos Personales: Nacido en Lagos de Moreno, Jalisco el 26 de Septiembre de 1987, hijo de Tomás Hernández Alcalá y Angelina Marín Torres.

Educación: Egresado de la Universidad Autónomas de Aguascalientes, grado obtenido en el año 2012.

Experiencia Profesional: Asistente en los laboratorios de Microbiología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes del año 2009 al 2012.