



UNAM IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y TOXICIDAD
GENERAL DE *Rosa centifolia* L.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
CLAUDIA REBECA RIVERA YÁÑEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado.

Dr. César Mateo Ortiz Flores.

Dra. Margarita Canales Martínez.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Biol. Luis Barbo Hernández Portilla.

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

CONACyT (Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciatura); proyecto No. 101974. 2009.

UNAM PAPCA 2009-2010

UNAM PAPIIT 207808

Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán
(MGU/Useful Plants Project Mexico)

*"Cuesta mucho educar a un hombre
pero cuesta mucho más no educarlo"*

Jesús Reyes Heróles

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por permitir mi formación dentro de sus aulas y comprender el verdadero significado de una carrera universitaria .

A la Dra. Margarita Canales por todos los consejos, apoyo pero sobre todo por la paciencia, gracias por ser un ángel tan grande, se dice que para enseñar se necesita vocación y es innegable que usted la tiene, muchísimas gracias.

A la Dra. Tzasna Hernández, ya que la convivencia a su lado me enriqueció muchísimo, gracias por el tiempo compartido y todas las observaciones brindadas a lo largo de la realización de esta tesis.

Al M. en C. Ángel Durán, por el apoyo brindado pero sobre todo por el tiempo que brindó para contestar hasta la mínima pregunta.

A mis Sinodales, por las observaciones brindadas ya que toda y cada una de ellas enriquecieron este trabajo, muchas gracias.

DEDICATORIAS

AMIS PADRES:

Si pudiera escoger a mis papas sin duda ustedes serian de nuevo los elegidos. En este momento de mi vida no tengo como agradecerles tantos sacrificios que han hecho por mí desde el momento en que nací, no cabe duda que ustedes son mi más grande ejemplo a seguir. Gracias por enseñarme que todo en esta vida se gane con un gran esfuerzo, gracias por guiarme cuando ya no había más luces en el camino, pero sobre todo gracias por amarme tanto y darme en el momento adecuado el jalón de orejas necesario para rectificar mi camino.

Con todo mi amor y admiración

AMIS HERMANAS:

Nelly:

No tengo palabras por todo el apoyo, compañía, consejos y risas que me has brindado, gracias por estar siempre y recordarme lo incondicional que es la familia. T.Q.M More.

Leilany:

A pesar de la edad entre nosotras sabes que te quiero muchísimo y agradezco los días y noches que con el simple hecho de jugar con Gus me ayudaste de una manera impresionante, tu también eres alguien fundamental en mi vida. T.Q.M Lany

AMIS BEBES:

Desde el momento en que llegaron a mi vida son mi luz en el camino, mi motivación y el motor que día a día me mantienen con actitud de triunfadora.

Gustavito:

Te amo, eres un pequeño ser que día con día me ayuda a ser una mejor persona, con inocencia y curiosidad me enseñas que la vida es un constante descubrimiento, muchísimas gracias mi amorcito.

Rebequita:

Aunque eres muy pequeña me ayudaste mucho a terminar este ciclo, ya que tu llegada fue inesperada pero muy deseada. Te amo nena.

GIOVANNI:

Cuando en la vida se cuenta con una persona como tú sin duda es un regalo de Dios, no hay palabras para agradecerte toda la paciencia y amor que me has demostrado, sabes que eres una pieza fundamental en mi andar, te amo flaquito y el hecho de estar terminando este ciclo a tu lado marca el inicio de una vida llena de felicidad juntos.

Eres el amor de mi vida.

AMI ABUELITA:

Aunque no lo creas, tu vida ha sido para mí la enseñanza mas grande, ya que gracias a tí he podido aprender que por más obstáculos que la vida te ponga siempre es mejor afrontarlos con una sonrisa en los labios y sobre todo con la frente en alto Te Amo abue y tu tenacidad será la mejor herencia que puedo tener en la vida

A los amigos:

No cabe duda que sin ustedes el hecho de soportar tanta carga sobre los hombros sería realmente un martirio, gracias a todos, a tí Tomás por todos los consejos y chistes brindados durante toda la carrera amigos como tú se cuentan con una sola mano, a Fátima, Blanca, Rous, Quique y Rupert, porque su compañía enriqueció y me dio una nueva perspectiva acerca del compañerismo y la amistad

A mis compañeros de Farmacognosia

A todos y cada uno de ellos muchísimas gracias, Karla, Ana, Lupita y Melissa por los momentos compartidos pero sobre todo por brindarme su amistad sincera, al joven Javier ya que su apoyo fue fundamental, llegaste como caído del cielo.

Dra. Margarita

Para cerrar con broche de oro es indispensable siempre lo mejor, y sin duda es usted; quiero agradecerle por ser no solo mi asesora, sino la mano que me ayudo en todo momento, gracias por los consejos, los chistes y alegría pero sobre todo por la paciencia brindada hacia la persona más despistada que existe. De nuevo mil gracias por ese enorme ángel que se convirtió para mí.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS PARTICULARES	8
MATERIAL Y MÉTODOS	9
Obtención del extracto metanólico	9
Obtención de la partición hexánica	9
Fraccionamiento biodirigido	9
Evaluación de la actividad antibacteriana	9
Cepas bacterianas	9
Evaluación cualitativa	10
Efecto del extracto activo sobre la curva del crecimiento bacteriano	10
Evaluación de la actividad antifúngica	10
Levaduras	10
Hongos filamentosos	11
Evaluación cualitativa para levaduras	11
Evaluación cuantitativa para levaduras	11
Evaluación cualitativa para hongos filamentosos	11

Evaluación cuantitativa para hongos filamentosos	11
Toxicidad general	12
Actividad antioxidante	12
Análisis estadístico	12
RESULTADOS	13
1. Datos de la especie <i>Rosa centifolia</i>	13
2. Rendimiento de extractos	13
3. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	15
4. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana	16
5. Efecto del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano	17
6. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica	18
7. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica	19
8. Aislamiento Biodirigido de la cromatografía en columna del extracto MeOH	20
9. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto MeOH	21
10. Caracterización química	23
10.1 Pruebas cualitativas para fenoles y alcaloides	23
10.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	23
11. Toxicidad General	26
12. Actividad Antioxidante	27

DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	34
APÉNDICE 1. <i>Rosa centifolia</i> L. Rosaceae	35
APÉNDICE 2. Maceración	37
APÉNDICE 3. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer	38
APÉNDICE 4. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	39
APÉNDICE 5. Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento)	42
APÉNDICE 6. Método de inhibición del crecimiento radial	43
APÉNDICE 7. Método de Toxicidad General	45
APÉNDICE 8. Actividad Antioxidante	46
REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos generales de la especie estudiada	13
Cuadro 2. Datos etnobotánicos de la planta estudiada	13
Cuadro 3. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> . $\frac{1}{2}$ CMI = 0.125 mg/mL; CMI = 0.25 mg /mL; CBM = 0.5 mg/mL.	14
Cuadro 4. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>V. cholerae</i> Tor. $\frac{1}{2}$ CMI=0.065mg/mL; CMI=0.125mg/mL; CBM=0.25mg/mL.	15
Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida Mínima (CBM) del extracto MeOH	17
Cuadro 6. Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial del extracto MeOH1 sobre <i>T. mentagrophytes</i>	19
Cuadro 7. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto MeOH de <i>R. centifolia</i>	21
Cuadro 8. Actividad antibacteriana de las fracciones del Extracto MeOH	22
Cuadro 9. Tiempo de retención y UV máxima de los compuestos de la fracción 12	25
Cuadro 10. Toxicidad General de MeOH sobre larvas nauplio II de <i>A. salina</i>	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rendimiento de los extractos de <i>R. centifolia</i>	14
Figura 2. Microorganismos sensibles al extracto MeOH1 de <i>R. centifolia</i>	16
Figura 3. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano (<i>S. aureus</i>)	17
Figura 4. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano (<i>V. cholerae</i> Tor)	18
Figura 5. Determinación de la CL ₅₀ de MeOH sobre <i>T. mentagrophytes</i>	20
Figura 6. Fracciones activas sobre <i>S. aureus</i>	22
Figura 7. HPLC de la fracción 12 del extracto MeOH1 de <i>R. centifolia</i>	24
Figura 8. Actividad Antioxidante del extracto MeOH	27
Figura 9. Detalle de flor y hojas de <i>Rosa centifolia</i>	36

RESUMEN

Las infecciones de la piel pueden ser producidas por bacterias, virus, hongos y artrópodos. Generalmente la mayoría de las infecciones bacterianas de la piel son infecciones localizadas, aunque algunas pueden extenderse y originar enfermedades sistémicas potencialmente mortales. En México el número de plantas medicinales usadas es cuantioso, una de estas especies es *Rosa centifolia* L., dicha especie es empleada en diversas regiones del país para aliviar padecimientos de la piel probablemente originados por algún microorganismos. Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar científicamente el uso tradicional de *R. centifolia*. Se obtuvo el extracto metanólico por medio de maceración. El extracto metanólico fue particionado con hexanos. Se evaluó la actividad antibacteriana (método de difusión en agar de Kirby–Baüer en 13 cepas bacterianas) y antifúngica (método cualitativo de inhibición del crecimiento radial en 5 cepas fúngicas). Así mismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) por la técnica de dilución en agar. La actividad antioxidante se evaluó por el método de reducción del DPPH. La toxicidad general se determinó utilizando larvas nauplio II de *Artemia salina*. Mediante una cromatografía en columna abierta, se obtuvieron las fracciones más activa responsable de la actividad antibacteriana. El extracto hexánico no mostró actividad antimicrobiana. El extracto metanólico inhibió el crecimiento de 5 cepas bacteriana (4 Gram positivas y 1 Gram negativas). Las cepas bacterianas más sensibles al extracto fueron: *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* Tor (CMI= 0.25 y 0.125 mg/mL respectivamente). Para ambas cepas el extracto metanólico mostró una actividad bacteriostática. El extracto metanólico presentó actividad antifúngica sobre *Trichophyton mentagrophytes* (CL₅₀= 1.68 mg/mL) y *Candida albicans*. De las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta, las fracciones más activas fueron la 12, 13 y 14, estas fracciones mostraron en su composición química la presencia de cumarinas y derivados del ácido benzoico. La actividad antioxidante del extracto metanólico tuvo el valor de CA₅₀= 2.83 µg/mL. Respecto a la toxicidad el extracto metanólico resultó moderadamente tóxico CL₅₀ = 116.27 µg/mL. Los resultados obtenidos explican el uso tradicional de *R. centifolia*.

INTRODUCCIÓN

Todos los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de una gran cantidad de plantas de su ambiente. Estos conocimientos, generalmente los acumulan determinados individuos tales como sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc., quienes los han transmitido generacionalmente a sus aprendices y descendientes (Domínguez, 1973).

Muchas de las civilizaciones usaron la naturaleza como fuente de remedios curativos. Los registros más antiguos de medicina datan de hace 3500 años, pero los paleontólogos han encontrado manojos de hierbas medicinales entre los restos fosilizados de nuestros ancestros neandertales (Polunin y Robbins, 1992).

Existen numerosas referencias de plantas medicinales en documentos de Babilonia, Egipto, India, China, Grecia y Roma, documentos que datan de entre los años 200 a 1500 a. C. (Gallardo, 1985). Específicamente, en México, los conocimientos acerca de las plantas medicinales datan de épocas anteriores a la conquista. Los indígenas, en consecuencia de su íntimo contacto con la naturaleza, adquirieron amplios conocimientos sobre las virtudes curativas de las plantas (Martínez, 1967). Los conceptos modernos de las plantas curativas iniciaron en el continente Europeo con la aparición de los herbarios en el siglo XVI, elaborados después de la Conquista (Lozoya y Velázquez, 1988).

En América la información sobre plantas medicinales fue adquirida por misioneros y viajeros españoles (Hamburguer y Hostettmann, 1991), siendo ellos quienes plasmaron todo ese conocimiento en obras como las de Bernardino de Sahagún, quien realizó una compilación de fuentes Náhuatl, registrado en el Códice Florentino (Ortiz, 1986), “Tesoro de la medicina o de las plantas medicinales de la Nueva España” de Gregorio López (1850) y el “*Libellus de Medicinalibus Indorum herbis*” escrito por Martín de la Cruz (Gutiérrez, 1989).

Años más tarde, con el auge de la medicina occidental y el inicio de la revolución industrial, se encontró que muchos de los compuestos responsables de las propiedades medicinales de las plantas (metabolitos secundarios), podían ser sintetizados a partir de reactivos químicos en el laboratorio, aminorando el interés por la medicina herbolaria y facilitando la producción de medicamentos para cubrir la demanda médica. Sin embargo, la sociedad médica no estaba conforme pues encontró que diversas sustancias usadas para tratamientos médicos tenían efectos drásticos en el organismo provocando, en ocasiones, hasta la muerte del paciente (Peña, 1976).

La sociedad médica también se percató de que gran parte de la población no podía acceder a la medicina científica por falta de recursos, por ello, en el año de 1975 la Organización Mundial de la Salud (OMS), promovió internacionalmente el estudio de la medicina tradicional popular de los países en vías de desarrollo (Aguilar, 1994). Así, en el año de 1978 la OMS definió como planta medicinal a cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003).

Por otro lado, se sabe que las infecciones de la piel pueden ser producidas por bacterias, virus, hongos y artrópodos. Generalmente la mayoría de las infecciones bacterianas de la piel son infecciones localizadas, aunque algunas pueden extenderse y originar enfermedades sistémicas potencialmente mortales (Ingraham e Ingraham, 1998).

De entre los microorganismos capaces de ocasionar enfermedades sistémicas se encuentran los estafilococos tales como *Staphylococcus epidermidis* que se encuentra en la piel y mucosa nasal de casi todas las personas, muchas personas sanas también albergan cepas virulentas de *S. aureus* en sus conductos nasales. Los estafilococos suelen infectar la piel y los tejidos blandos subyacentes, aunque está documentada la existencia de infecciones estafilocócicas que afectan a cualquier

órgano del cuerpo, como los huesos, las articulaciones, pulmones y el corazón principalmente (Ingraham e Ingraham , 1998).

Se sabe que la resistencia a los antibioticos puede ser natural o adquirida, esta última es el resultado de la adecuación al medio de las mutaciones ocurridas al azar en un lapso evolutivo muy prolongado, es decir un cambio genético estable, hereditario de generación en generación (Kumate, 1981)

A pesar de que la penicilina era la mejor solución para las infecciones estafilocócicas, con el tiempo dichas bacterias han generado resistencia a este antibiótico en particular, en la actualidad son tratadas con penicilinas semisintéticas, como la meticilina, sin embargo, también han surgido cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (Ingraham e Ingraham, 1998). Por lo que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento contra estas bacterias está enfocada básicamente en los productos naturales.

Las infecciones causadas por hongos también son comunes y en muy pocos casos graves. Los dermatofitos son un grupo de hongos que infectan las superficies internas del organismo produciendo el pie de atleta y las tiñas. Se calcula que al menos el 90% de los varones se han infectado al menos una vez en su vida al llegar a los 40 años, pero no se sabe por qué las mujeres no se infectan con tanta frecuencia. Aunque las infecciones causadas por dermatofitos son superficiales y la mayoría pueden curarse mediante agentes antifúngicos, se sabe que algunos de estos pueden tener efectos colaterales graves.(Ingraham e Ingraham, 1998).

Por lo anterior, es conveniente recalcar que la importancia de los estudios actuales sobre las plantas medicinales, radica en que estas presentan ventajas indiscutibles con relación a los medicamentos alópatas o fármacos sintéticos, ya que estos pueden provocar efectos colaterales negativos, lo cual, hace que sean cada vez más las personas que regresan a la búsqueda de alternativas naturales (Palacios, 2005).

Debido a esto el mundo ha volteado la vista al mundo botánico, del cual se sabe que las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda et al., 2004). Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros o con actividad antioxidante (Croteau et al., 2000). La síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo de herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda et. al, 2004).

México es un claro ejemplo del empleo de las plantas medicinales y uno de los lugares donde dicho conocimiento se utiliza es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, donde el uso de la medicina tradicional es cosa de la vida cotidiana, debido a esto el número de plantas medicinales usadas es cuantioso, una de estas es *Rosa centifolia* L., dicha especie es usada para aliviar padecimientos de la piel probablemente originados por algún microorganismo (Canales et al., 2005 y 2006). Por lo antes mencionado, *R. centifolia* es el objeto de estudio de esta investigación.

ANTECEDENTES

- El primer registro de *R. centifolia* como planta medicinal se remonta al siglo XVI por Francisco Hernández, el cual señala que es utilizada para evacuar la bilis. A finales del siglo XVIII Juan de Esteyneffer menciona que esta especie es empleada para aliviar malestares del estómago, riñones,

pulmones, espalda, cabeza, pecho, garganta, supuraciones, cólera, vómito y para las lombrices (Argueta y Cano, 1994).

- Maximino Martínez la indica como catártico y vulnerable; la sociedad Farmacéutica de México cita la misma información de Martínez y agrega su uso como astringente (Argueta y Cano, 1994).
- Se tienen muy pocos estudios sobre *R. centifolia*, caso concreto es la investigación realizada por Canales et al., (2005) donde se reporta que el extracto metanólico presentó actividad antibacteriana sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*.
- Diversas investigaciones se han realizado en torno a la familia Rosaceae, una de ellas determinó la actividad antibacteriana de *R. gallica* contra *Bordetella bronchiseptica* y *Bacillus cereus* (Bonjar, 2004).
- Un trabajo realizado en *R. rugosa* permitió descubrir que el elemento antimicrobial de la planta es un sesquiterpeno (Hashidoko et al., 1989).
- Otro de los casos en los que la familia Rosaceae es puesta a prueba contra bacterias es la realizada por Kumarasamy y colaboradores (2002) donde *R. canina* presentó efecto contra *Escherichia coli*.
- Estudios recientes determinaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *R. damascena* contra tres diferentes cepas de *Xanthomonas axonopodis* teniendo efecto inhibitorio contra todas ellas (Basim y Basim, 2003).
- Se ha registrado la actividad antimicrobiana en *R. pisiformis*, donde la extracción tanto de compuestos solubles e insolubles en agua tuvieron actividad sobre *Bacillus catarrhalis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Helicobacter pylori* y el hongo *Trichophyton rubrum* (Buruk et al., 2006)

- Otro estudio menciona la capacidad antioxidante del aceite esencial de *R. ribiginosa* esto en España (Franco et al., 2007a).

De tal manera se sabe que las plantas pertenecientes del género *Rosa* tienen cierto grado de actividad antibacteriana, pero sobre *R. centifolia* (Apéndice 1) en particular se tiene escasa información.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antimicrobiana y toxicidad general de *Rosa centifolia*

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener el extracto metanólico y su partición hexánica.
2. Evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana del extracto metanólico y su partición hexánica.
3. Evaluar cuantitativamente la actividad antimicrobiana del extracto activo.
4. Determinar la toxicidad general y actividad antioxidante del extracto activo.
5. Realizar el aislamiento biodirigido de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana

MATERIAL Y MÉTODOS

La planta fue comprada en el mercado de Ajalpa, Puebla, en Agosto del 2008 e identificada en el Herbario de la FES-Iztacala con el nombre de *Rosa centifolia* L. y número de colecta MCM39.

Obtención del extracto metanólico

Una vez secas las flores (96.67 g), se llevó a cabo una maceración para obtener el extracto metanólico de la planta (Apéndice 2),

Obtención de la partición hexánica

Para la obtención del extracto hexánico se realizó una partición del extracto metanólico. De esta forma se obtuvieron el extracto hexánico y el extracto metanólico libre de compuestos no polares (MeOH) (Domínguez, 1973).

Evaluación de la actividad antibacteriana

Cepas bacterianas.

Los microorganismos empleados para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos fueron: *Vibrio cholerae* No.01, *Vibrio cholerae* INDRE 206. *V. cholerae* aislada de un caso clínico, correspondiente al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor, *V. cholerae* CDC V 12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Enterobacter aerogenes* y *Bacillus subtilis* (donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán), *Yersinia enterocolitica* (donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES-Iztacala), *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis* y *Sarcina lutea* (donadas por la FES-Cuautitlán).

Evaluación cualitativa

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietink, 1991). Los sensibilizadores fueron impregnados con 2 mg de los dos extractos obtenidos. Como control positivo se utilizaron sensibilizadores impregnados con 25 µg de cloranfenicol; como controles negativos los sensibilizadores fueron impregnados con 10 µL del solvente respectivo. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 3).

Evaluación cuantitativa

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se utilizó el método modificado de dilución en agar (Ávila, 1996). Las concentraciones utilizadas para los bioensayos fueron de: 3.0, 2.5, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, y 0.125 mg/mL del extracto que presente actividad antimicrobiana. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 4).

Efecto del extracto activo sobre la curva del crecimiento bacteriano

El estudio se determinó de acuerdo al método propuesto por Kubo y colaboradores (Kubo et al., 1993; citado en Ávila 1996) (Apéndice 5). Las concentraciones evaluadas fueron ½ CMI, CMI y CBM del extracto MeOH y se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento bacteriano durante 24 horas.

Evaluación de la actividad antifúngica

Las especies de los hongos utilizados para evaluar la actividad antifúngica fueron:

Levaduras

Se utilizaron *Candida albicans* (caso clínico) (donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES-Iztacala), *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14065, *Cryptococcus neoformans* (donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán).

Hongos filamentosos

Fueron utilizados *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum* ATCCNRL 3299, *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia solani*, donadas por el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala.

Evaluación cualitativa para levaduras

Para determinar la actividad antifúngica en levaduras se llevó a cabo el mismo ensayo que en las bacterias, mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden Berghe, y Vlietinck, 1991) (Apéndice 3).

Evaluación cuantitativa para levaduras

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) fue utilizado el mismo método que en las bacterias (Apéndice 4).

Evaluación cualitativa para hongos filamentosos

Para evaluar la actividad antifúngica se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) fueron impregnados sensidiscos con 2 mg de los diferentes extractos. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con Ketoconazol (7 µg). Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 6).

Evaluación cuantitativa para hongos filamentosos

Para determinar la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial, para lo cual el extracto fue diluido en el agar (Wang y Bun, 2002). Las concentraciones empleadas para los ensayos fueron: 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, mg/mL. Cada ensayo se realizó por triplicado (Apéndice 6).

Fraccionamiento biodirigido

Se llevó a cabo una cromatografía de columna abierta del extracto MeOH. Las alícuotas que se obtuvieron fueron de un volumen de 250 ml. Se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna, esto con la finalidad de agrupar las fracciones similares. Se evaluó la actividad antimicrobiana de cada fracción (para bacterias y levaduras método de difusión en agar de Kirby-Baüer; para hongos filamentosos método de inhibición del crecimiento radial) con el propósito de identificar las fracciones con actividad antimicrobiana.

Toxicidad general

La toxicidad general se evaluó para la fracción que presentó mayor actividad. Los ensayos se realizaron con larvas nauplio II de *Artemia salina*, siguiendo el método de McLaughlin (1991), a concentraciones de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, teniendo como control positivo ácido gálico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 7).

Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) método modificado de Murillo, 2006 (Apéndice 8).

Análisis estadístico

A los datos estadísticos de la actividad antibacteriana se les realizó un análisis de varianza unifactorial. Para el cálculo de las CL_{50} de toxicidad y antioxidantes se llevo cabo un análisis de regresión, para ajustar una hipérbola rectangular.

RESULTADOS

1. Datos de la especie *Rosa centifolia*

Los datos de la especie utilizada en la investigación se aprecian en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Datos generales de la especie estudiada

Nombre científico	<i>Rosa centifolia</i>
Familia	Rosaceae
Nombre común	Rosa de castilla
Forma de uso	Infusión

Cuadro 2. Datos etnobotánicos de la planta estudiada

Parte usada de la planta	Flor
forma de preparación	Maceración
Época de colecta	Agosto - 2008

2. Rendimiento de extractos

Dentro del cuadro tres se observa que el extracto de menor rendimiento fue el extracto el hexánico con 1.55 g (1.60%), en contraste el extracto con mayor rendimiento fue el metanólico con 37.25 g (38.53%). Al momento en que se realizó la partición de MeOH se pudieron apreciar sustancias que no eran solubles en

ninguno de los dos solventes utilizados, de tal modo que se nombró como interfase, la cual presentó un rendimiento de 2.50 g (2.58%).

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos obtenidos de *Rosa centifolia*.

Extracto	Rendimiento g	Rendimiento %
Metanólico	37.25 g	38.53%
Hexánico	1.55 g	1.60%
Interfase	2.50 g	2.58%

El rendimiento fue calculado respecto a 96.67 g de flores secas

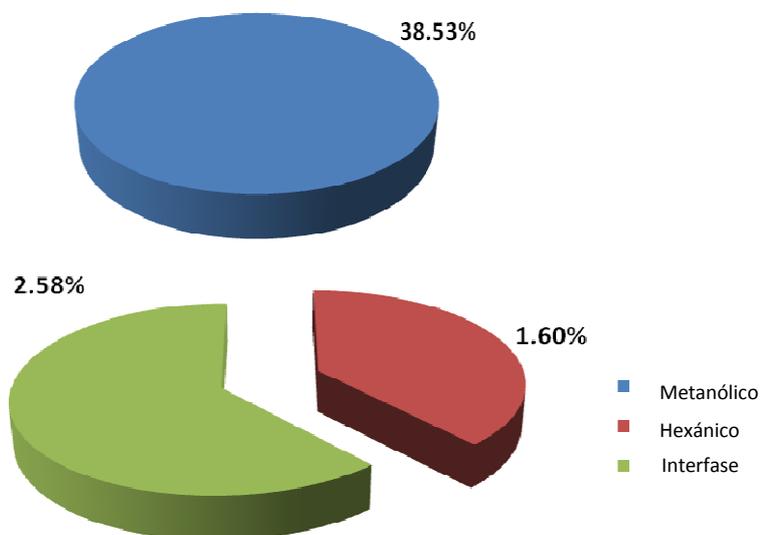


Figura 1. Rendimiento de los extractos de *R. centifolia*

3. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Unicamente el extracto MeOH tuvo actividad sobre *S. lutea*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *V. cholerae* (Tor). Los datos se aprecian en el cuadro 4 así como en la Figura 2.

Los resultados del análisis de varianza aplicada para comparar el halo de inhibición de las cinco cepas bacterianas mostro que si existen diferencias significativas ($F=33.6$ $P= 1.18 \times 10^{-6}$) entre ellos.

Cuadro 4. Actividad antibacteriana del extracto MeOH de *R. centifolia*.

Microorganismo	Extracto MeOH (mm)
<i>S. lutea</i>	11.3 ± 0.11
<i>B. subtilis</i>	14.6 ± 0.15
<i>S. epidermidis</i>	20.3 ± 0.20
<i>S. aureus</i>	16.6 ± 0.15
<i>V. cholerae</i> (Tor)	7.6 ± 0.05

Halos de inhibición en milímetros (datos promedio de tres repeticiones). El extracto fue probado a una concentración de 2 mg/sensidisco

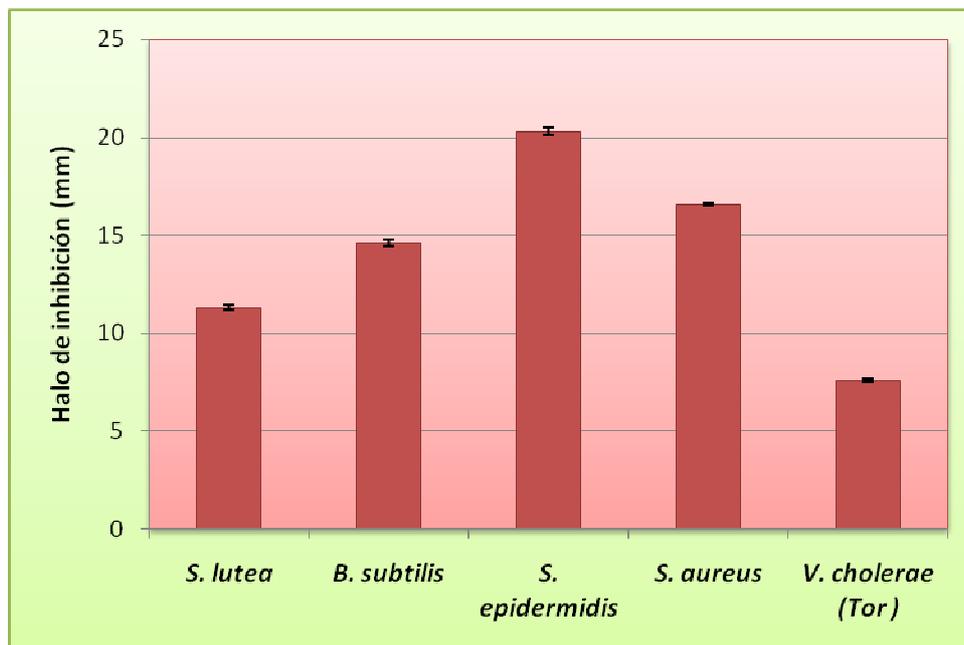


Figura 2. Microorganismos sensibles al extracto MeOH1 de *R. centifolia*

4. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

Las bacterias más sensibles al extracto MeOH fueron *V. cholerae (Tor)* con valores de 0.125 mg/mL para CMI y 0.25 para CBM y *S. aureus* con cifras de 0.25 mg/mL para CMI y 0.25 mg/mL para CBM, por el contrario la bacteria menos sensible fue *B. subtilis* con valores por arriba de los 3.0 mg/mL tanto para CMI como para CBM. Los resultados de los análisis cuantitativos se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida Mínima (CBM) del extracto MeOH.

Microorganismo	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>S. lutea</i>	0.75	1.0
<i>S. epidermidis</i>	1.5	2.0
<i>S. aureus</i>	0.25	0.5
<i>B. subtilis</i>	>3.0	>>3.0
<i>V. cholerae (Tor)</i>	0.125	0.25

>= Mas de, >>= Muy por encima de

5. Efecto del extracto MeOH sobre la curva de crecimiento bacteriano

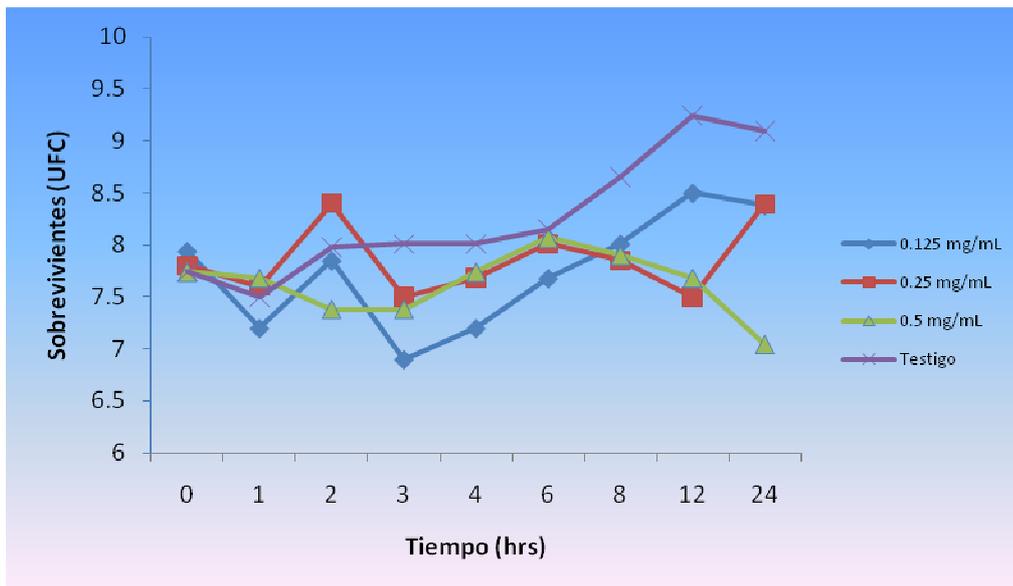


Figura 3. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano de *S. aureus*. $\frac{1}{2}$ CMI = 0.125 mg/mL; CMI = 0.25 mg/mL; CBM = 0.5 mg/mL.

El extracto metanólico presentó una actividad bacteriostática sobre *S. aureus*, ya que después de una exposición de 24 horas solo se observa una reducción de la población, más no un descenso total de la misma (Figura 3).

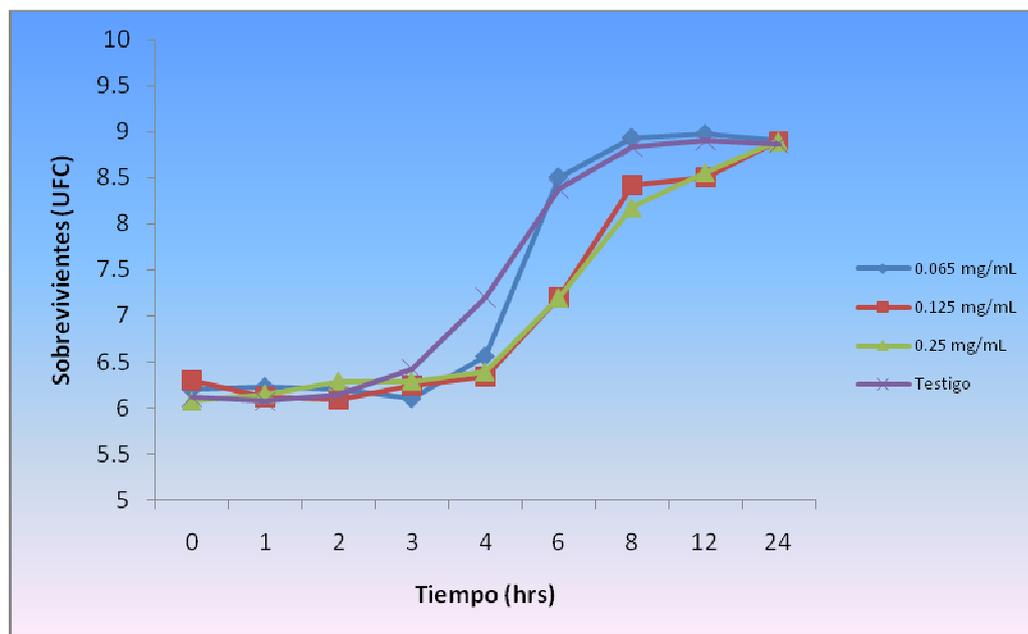


Figura 4. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano de *V. cholerae* Tor. $\frac{1}{2}$ CMI=0.065mg/mL; CMI=0.125mg/mL; CBM=0.25mg/mL.

Con respecto a la actividad del extracto MeOH sobre la curva de crecimiento bacteriano de *V. cholerae* (Tor), se puede observar en la figura 4 que la disminución de la población bacteriana expuesta a las concentraciones de $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM fue mínima, ya que la curva de crecimiento se mantuvo con la misma tendencia que el grupo testigo.

6. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

El extracto MeOH sólo presentó actividad sobre *C. albicans* (CUSI) con un halo de inhibición de 16 mm (siendo este el promedio de tres repeticiones) y *T. mentagrophytes* dando positivo en la prueba de inhibición del crecimiento radial. El extracto hexánico no presentó actividad antifúngica.

7. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.

Con respecto a la prueba cuantitativa de la actividad antifúngica de MeOH1 se obtuvo para *C. albicans* (CUSI) los valores de CMI <2.0 mg/mL y CFM << 2.0 mg/mL. Los resultados del bioensayo realizado con *T. mentagrophytes* se observan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial del extracto MeOH1 sobre *T. mentagrophytes*.

Concentración (mg/mL)	MeOH
	% de Inhibición
4.0	100
3.0	62.2
2.0	49.3
1.0	0
0.75	0
0.5	0

De acuerdo con lo obtenido en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto MeOH sobre *T. mentagrophytes* se calculó una CL₅₀ (Concentración letal media) obteniendo un valor de 1.68 mg/mL, y la CFM se observó a 4.0 mg/mL (Figura 5).

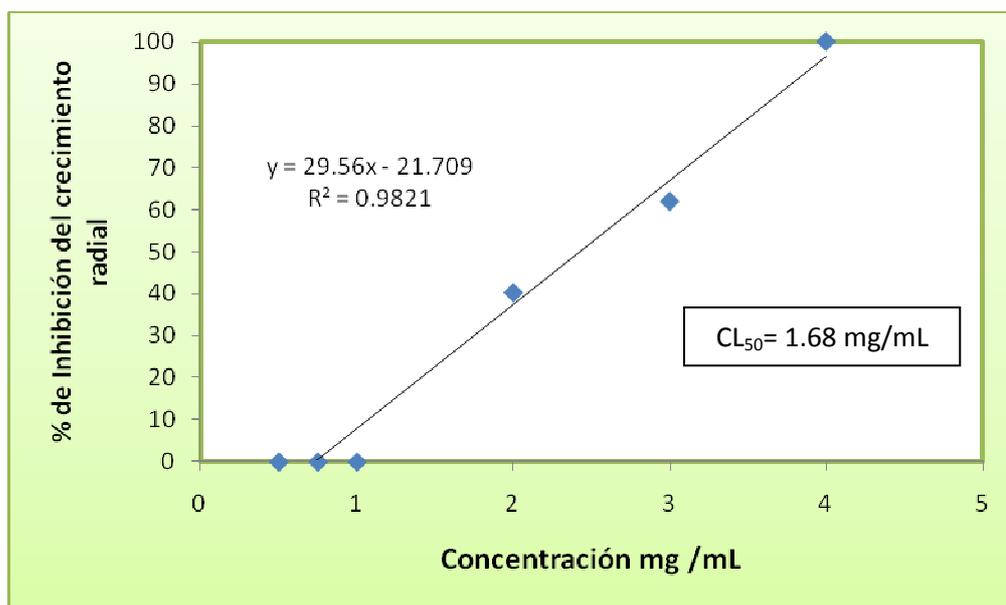


Figura 5. Determinación de la CL_{50} de MeOH sobre *T. mentagrophytes*

8. Aislamiento Biodirigido de la cromatografía en columna del extracto MeOH.

Se obtuvieron 308 alicuotas de 250 mL cada una, las cuales se agruparon 29 diferentes fracciones (Cuadro 7).

Cuadro 7. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto MeOH de *R. centifolia*.

Fase Móvil	Fracción obtenida
Hexano / Acetato de Etilo 1:1	1 – 4
Hexano / Acetato de Etilo 4:6	5 – 7
Hexano / Acetato de Etilo 3:7	8 – 11
Acetato de Etilo	12 – 14
Acetato de Etilo / Metanol 9:1	15 – 22
Acetato de Etilo / Metanol 8:2	23 – 24
Acetato de Etilo / Metanol 7:3	25
Acetato de Etilo / Metanol 6:4	26
Acetato de Etilo / Metanol 1:1	27 – 28
Metanol	29

9. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto MeOH.

Los resultados mostraron que las fracciones que contienen la actividad antibacteriana más notable sobre *S. aureus* son la 12, 13 y 14, de las cuales el que mostro el mayor halo de inhibición fue el numero 13 (15.5 mm), dichos resultados se muestran en el cuadro 8 y figura 6.

Cuadro 8. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la cromatografía del extracto MeOH.

Fracción	Halo de Inhibición (mm)	Rendimiento (mg)
4	6.5	40
5	6	40
6	6.5	30
9	7	10
12	12.5	30
13	15.5	30
14	13	120
16	8.75	930

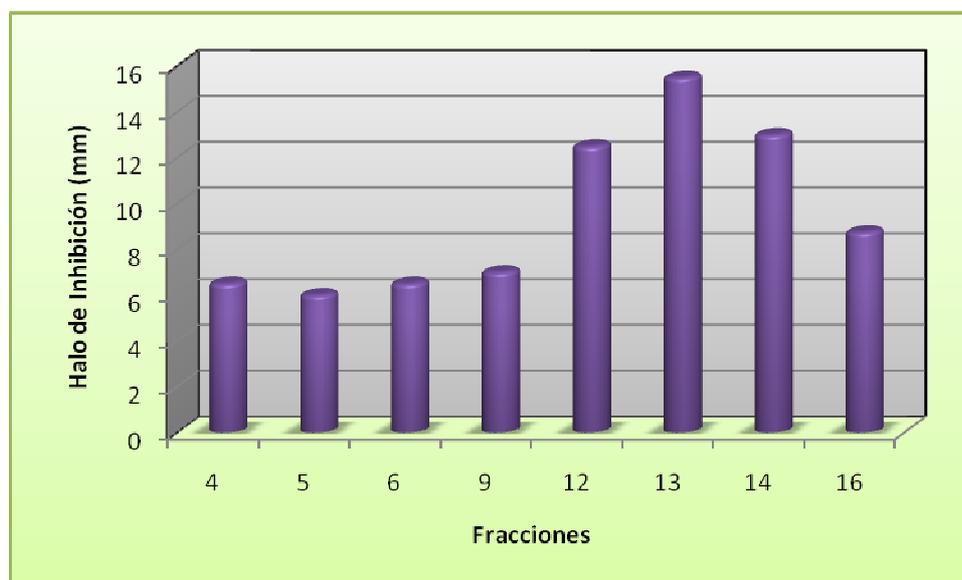


Figura 6. Sensibilidad de *S. aureus* a las fracciones del extracto MeOH

10. Caracterización química

10.1 Pruebas cualitativas para fenoles y alcaloides

El extracto MeOH en presencia de gotas de FeCl_3 dio un color azul oscuro, lo cual indica presencia de fenoles.

El extracto MeOH en presencia del reactivo de Dragendorff mostro un precipitado rojizo y con el reactivo de Mayer un precipitado blanco lo cual indica que probablemente haya alcaloides en el extracto.

10.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Análisis de las fracciones 12,13 y 14 por HPLC.

Para el HPLC se analizaron las fracciones 12, 13 y 14, ya que fueron las que presentaron los halos de inhibición de mayor diametro sobre *S. aureus*, en dicho estudio se pudo observar la señal de cinco compuestos (cuadro 10), de los cuales el No. 2 es el que presenta el pico mayoritario con un tiempo de retención de 3.06 min. y una absorción máxima bajo luz UV de 272 nm, seguido por el compuesto No. 1 que obtuvo un tiempo de retención de 2.82 y una absorción máxima bajo luz UV igual a la del compuesto 2 (Figura 7).

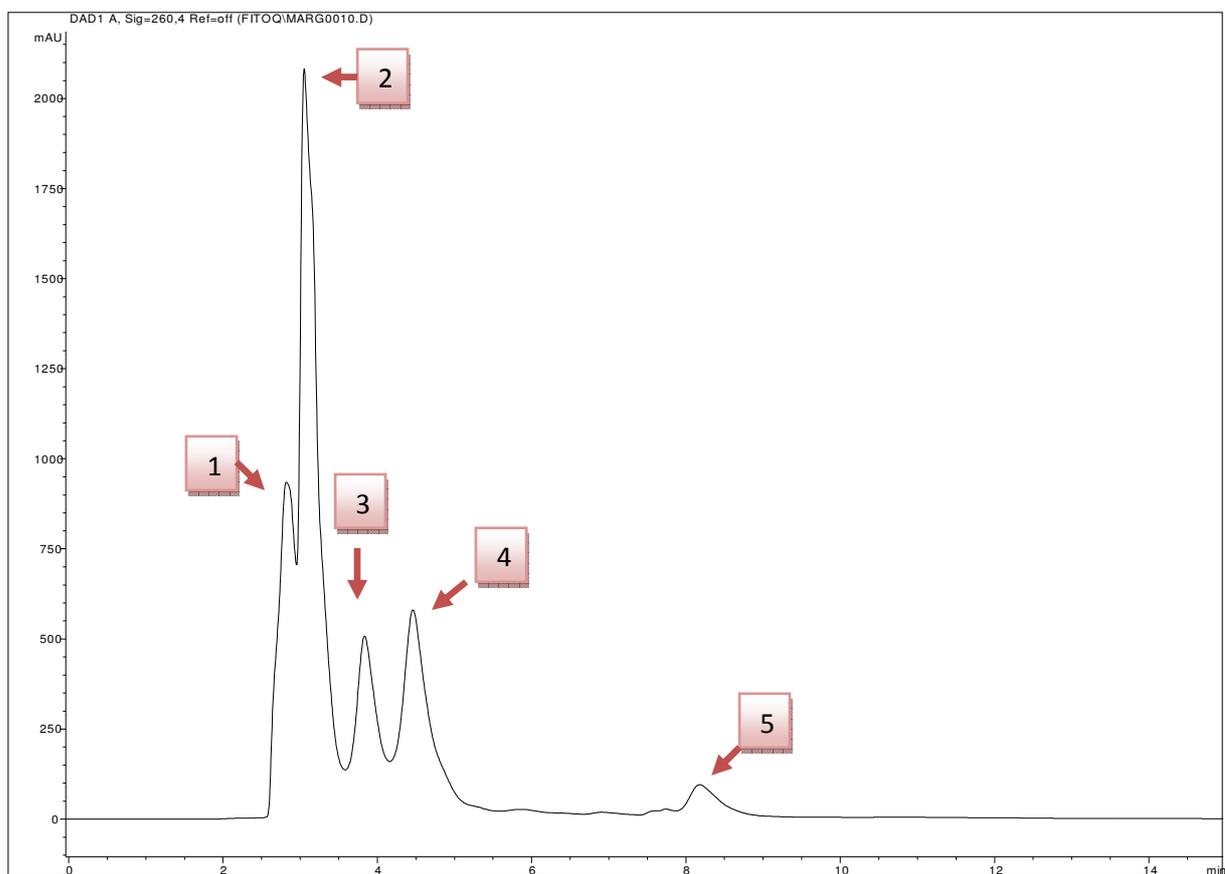


Figura 7. HPLC de la fracción 12 del extracto MeOH1 de *R. centifolia*.

Cuadro 9. Tiempo de retención y UV máxima de los compuestos de la fracción 12

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	UV λ máxima (nm)	Compuesto
1	2.82	272	Derivado del ácido benzoico
2	3.06	272	Derivado del ácido benzoico
3	3.82	232 , 262 , 292	Cumarina
4	4.45	274	Derivado del ácido benzoico
5	8.18	258 , 292	Cumarina

Como se puede observar en el Cuadro 9, las fracciones activas estuvieron compuestas por una cumarina (compuesto 3) y por derivados del ácido benzoico (compuestos 1, 2 y 4).

11. Toxicidad General

Los resultados obtenidos en la prueba de toxicidad realizada sobre larvas nauplio II de *Artemia salina* muestran que el extracto MeOH posee una CL_{50} de 116.27 mg/mL, lo anterior se interpreta como un nivel de toxicidad moderada (Padmaja, et al., 2002), El ácido gálico presentó una CL_{50} = 321.5 mg/mL.

Cuadro 10. Toxicidad General de MeOH sobre larvas nauplio II de *A. salina*.

Concentración (ppm)	% de muerte
1000	100
100	47
10	6.66

12. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante del extracto MeOH de *R. centifolia* mostro una CL_{50} de 16.6 mg/mL para el extracto MeOH, como control fue utilizada la Catequina con una CL_{50} de 2.83 mg/mL (Figura 8) los anteriores valores son necesarios para reducir en un 50% el DPPH.

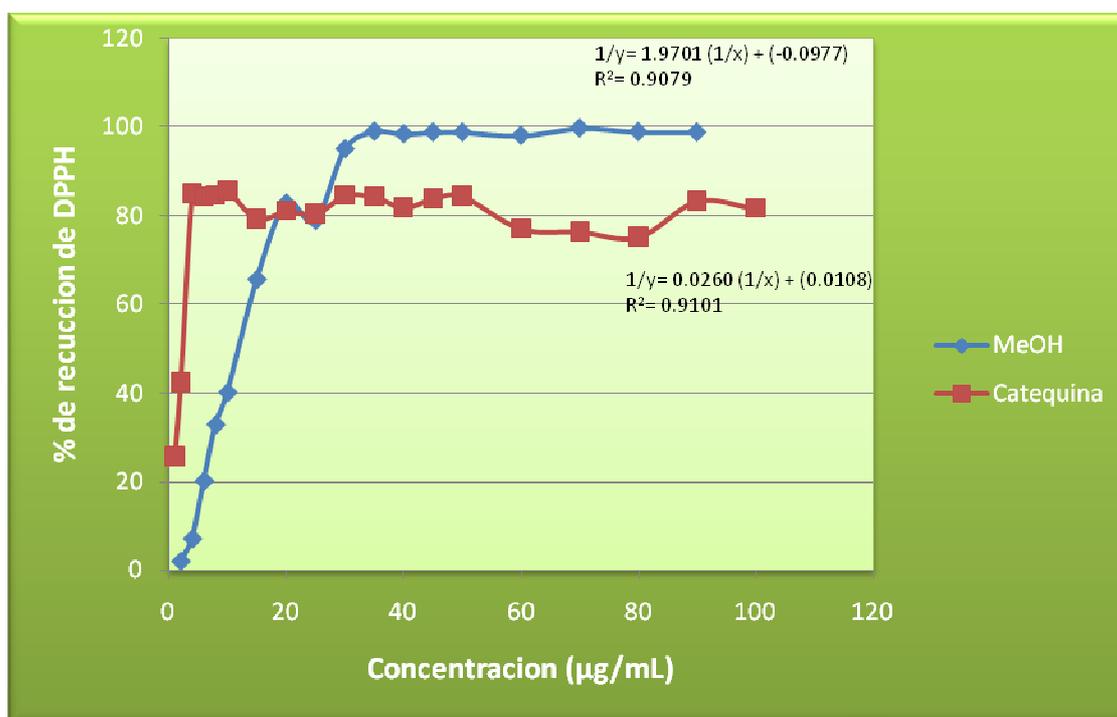


Figura 8. Actividad antioxidante del extracto MeOH

DISCUSION

Resulta de suma importancia contar con estudios que avalen el uso medicinal de las plantas utilizadas por los pobladores de cualquier comunidad, aunque *R. centifolia* es un planta introducida en nuestro país su importancia desde el punto de vista fitoquímico es relevante, ya que se encuentran reportes de su uso desde el siglo XVIII para aliviar malestares del estómago, riñones, pulmones, espalda, cabeza, pecho, garganta, supuraciones, cólera, vómito y para las lombrices (Argueta y Cano, 1994), aun más importante es el avalar el estudio tradicional con bioensayos más específicos y puntuales como el realizado por Canales y colaboradores en 2005 quienes mencionan la actividad del extracto metanólico de dicha especie, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

De acuerdo a lo obtenido en el rendimiento de los extractos de *R. centifolia* es posible decir que el de mayor rendimiento fue del extracto metanólico con un 38.53%, a diferencia del extracto hexánico el cual obtuvo un rendimiento de 1.60% siendo así el de menor rendimiento (Figura 1). Lo anterior muestra claramente que las flores secas de *R. centifolia* contienen una mayor cantidad de compuestos de naturaleza polar, estos resultados coinciden con investigaciones realizadas sobre otras spp del género *Rosa* (Hashidoko et. al, 1989; Wilkes y Glasl, 2001; Strack et. al, 1990; Wallaart, 1980; Catalano et. al, 1995; Jin y Sato, 2003; Chang y Jeon, 2003). De igual manera se encuentran citas bibliográficas las cuales hacen referencia a que los extractos metanólicos de la familia Rosaceae poseen una actividad antibacteriana mayor (Kumarasamy et. al, 2002).

Respecto a la actividad antibacteriana fue posible observar una mayor tendencia por inhibir bacterias Gram positivas (Cuadro 4), esto concuerda con los primeros reportes que datan del siglo XVI por Francisco Hernández, el cual menciona que *R. centifolia* es utilizada para aliviar infecciones en la piel, dicho resultado es muy certero, ya que algunas de las principales bacterias causantes de infecciones en la

piel son *S. aureus* y *S. epidermidis* (Canales et. al, 2005), cabe destacar que los halos de inhibición de estas bacterias fueron de 16.6 mm y 20.3 mm respectivamente, lo cual se encuentra muy por encima de lo reportado en la literatura, ya que para *S. aureus* se reportan halos de inhibición de 7-9 mm (Bonjar, 2004) y para *S. epidermidis* los halos reportados fueron de 3-4 mm (Rahua et al., 2000). Los datos anteriores pueden ser el resultado tanto de la implementación de diferentes técnicas de extracción así como del género de la familia Rosaceae utilizado, en el caso de *S. epidermidis* el género estudiado fue *Rubus* y la mezcla utilizada para la maceración fue de un 80% de metanol acuoso, en el caso de *S. aureus* la extracción fue la misma que se utilizó en el presente trabajo pero el género fue de nueva cuenta *Rubus*, lo anterior demuestra que a pesar de que las dos especies pertenecen a la misma familia la actividad antibacteriana difiere de una manera considerable entre géneros. Se sabe que la familia Rosaceae ha presentado actividad antibacteriana sobre *Bacillus cereus* (Bojar, 2004) , *Micrococcus luteus* (Rahua et al., 2000) así como *Bacillus subtilis* (Thiem y Goslinska, 2004) todas Gram positivas; sin embargo no hay que dejar de lado la actividad sobre las bacterias Gram negativas, ya que el extracto MeOH presentó actividad sobre *V. cholerae* (Tor) con un halo de inhibición de 7.6 mm (Cuadro 4), cabe destacar que este es el primer registro que se proporciona sobre la inhibición de dicha bacteria por el extracto de una especie de la familia Rosaceae, ya que solo se encuentran registros de la acción sobre bacterias Gram negativas por diferentes géneros dentro de la familia Rosaceae tales como *Xanthomonas axonopidis* (Basim y Basim, 2003), *Helicobacter pylori* (Buruk, 2006) y *Pseudomonas aeruginosa* (Rahua et al., 2000).

En cuanto a los datos obtenidos en los estudios cuantitativos es posible decir que *V. cholerae* Tor obtuvo una CMI de 0.125 mg/mL y una CBM de 0.25 mg/mL, ambos valores son más pequeños en comparación con los obtenidos por *S. aureus* donde la CMI obtuvo un valor de 0.25 mg/mL y CBM de 0.5 mg/mL (Cuadro 5). Como se había mencionado anteriormente los resultados presentados para *V. cholerae* (Tor) son los primeros de su tipo y es posible decir que estos son relativamente bajos, ya

que el extracto utilizado no es puro, es decir las sustancia activa aún no es aislada por lo cual es necesario seguir con los bioensayos en cuanto se cuente con el compuesto o compuestos esta sustancia completamente puros. En el caso de los valores registrados por *S. aureus* estos son menores a los reportados por Thiem y Goslinska en 2004, quienes evaluaron la actividad antibacteriana de una sp de la familia Rosaceae *Rubus chamaemorus*, los investigadores reportan valores de 0.58 mg/mL para CMI y 2.33 mg/mL para CBM, lo cual puede atribuirse al solvente utilizado, ya que este fue butanol el cual se sabe que posee una polaridad menor a la del metanol, debido a esto es posible que los compuestos extraídos no posean la misma actividad inhibitoria a comparación de los extraídos por el metanol, seguramente la razon determine la diferencia ya que como se menciona la especie a la cual se le hizo la extracción fue *Rubus chamaemorus*.

De acuerdo a las curvas de crecimiento bacteriano se observo un efecto bacteriostático del extracto MeHO sobre *S. aureus* y *V. cholerae* (Tor), donde en la concentración utilizada para CBM sobre *S. aureus* se aprecia un descenso de la población durante los primeros 4 tiempos, sin embargo, a las 6 horas la población se recupera y aumenta, se sabe que el Cloramfenicol es un antimicrobiano comercial el cual posee una acción bacteriostática, ya que bloquea reversiblemente el funcionamiento del ribosoma (Davis y Dulbecco, 1996), la acción le extracto MeOH no tiene que ser demeritada, ya que al actuar de esta manera sobre las bacterias da oportunidad al sistema inmune de desplegar su abanico de reacciones y anticuerpos para defender a la persona afectada por dicha bacteria. En el caso de *V. cholerae* (Tor) las concentraciones de CMI y CBM se observan levemente por debajo del testigo, este comportamiento puede deberse a que las bacterias Gram positivas poseen una membrana externa, la cual actúa como una barrera de permeabilidad que le provee menos sensibilidad a los antibióticos (Davis y Dulbecco, 1996).

Respecto a la actividad antifúngica presentada sobre *C. albicans* se observa que utilizando concentraciones mayores a 2.0 mg/mL se da una disminución en el

crecimiento de la levadura, dicho resultado muestra que el uso medicinal que se le ha dado a la planta está comprobado, ya que según lo reportado por Canales y colaboradores en 2005 *R. centifolia* es utilizado para aliviar infecciones vaginales, dicha enfermedad puede ser ocasionada por *C. albicans* (Davis y Dulbecco, 1985; Pan et al., 2009). Por otro lado, el extracto MeOH tuvo actividad sobre *T. mentagrophytes* el cual es el dermatofito causante del pie de atleta, dicho extracto presento un 100% de inhibición sobre *T. mentagrophytes* a una concentración de 4.0 mg/mL y una CL₅₀ de 1.68 mg/mL, cabe destacar que Hashidoko y colaboradores en 1989 emplearon el extracto de las hojas de *Rosa rugosa* sobre el hongo *Cladosporium herbarum* causando una prominente inhibición del crecimiento a una concentración de 3.75 mg/mL.

En cuanto a las 29 fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta, del análisis realizado por HPLC de las fracciones 12, 13 y 14, mostró la presencia de 5 compuestos (Cuadro 9) de los cuales los números uno, dos y cuatro se identificaron como derivados del ácido benzoico, ya que el ácido benzoico presenta un pico de absorción máxima bajo luz ultravioleta a 270 nm (Van Sumere, 1989 citado en Dey y Harborne, 1989). En investigaciones anteriores en torno a la familia Rosaceae demuestran la presencia de dichos compuestos tales como ácido hidroxicinámico (Strack et al., 1990), también es posible mencionar que muchas especies dentro de esta familia contienen sustancias fenólicas, ácido hidroxicinámico y/o taninos (Wilkes y Glasl, 2001), en 2000 Rauha y colaboradores mencionan la actividad antibacteriana sobre *S. aureus* de compuestos fenólicos dentro del género *Rubus*, los investigadores añaden que es difícil determinar cuál es el causante de esta actividad debido a la poca información existente, por tanto, la actividad antimicrobial de compuestos fenólicos es una de las búsquedas más importantes en los últimos años (Jin y Sato 2003). En cuanto a *R. centifolia* la información es aun más reducida y se propone seguir con las investigaciones para ampliar la información que se tiene sobre la especie. Con respecto a los compuestos 3 y 5, éstos se identificaron como cumarinas, se sabe que son sustancias fenólicas hechas por la fusión de benceno y

anillos alfa pirona y que presentan un banda muy amplia de absorción a 280-290 nm bajo luz ultravioleta (Ibrahim y Baron, 1989 citados en Dey y Harborne, 1989). Estos compuestos se extraen con acetato de Etilo o Eter (Harbone, 1973). En cuanto a su efecto antimicrobiano se debe a su interacción con el ADN (Cowan, 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos para la toxicidad, al determinar la CL₅₀ del extracto MeOH, el cual fue de 116.27 mg/mL es posible decir que este extracto mostró una toxicidad moderada siguiendo el criterio de Padmaja et al. (2002).

En cuanto a la actividad antioxidante del extracto MeOH la CL₅₀ de *R. centifolia* fue de 16.67 mg/mL, es posible decir que es buena, ya que estudios realizados por Al-Fatimi y colaboradores en 2007 con diversas plantas medicinales muestran valores que van desde 13.6 hasta 96.6 mg/mL, hay que destacar que este es el primer estudio de dicha naturaleza realizado a la especie, estudios realizados a *Rosa rubiginosa* muestran que el extracto metanólico de las semillas tiene un 52.2% de inhibición a una concentración de 1 mg/mL, atribuyendo dicho valor a la presencia de polifenoles en esta especie (Moure et al, 2001). De acuerdo con los compuestos aislados de la cromatografía en columna abierta es posible mencionar que los fenilpropanoides de diversas frutas y vegetales, son poderosos antioxidantes capaces de consumir el H₂O₂ y contribuir con el estado de oxido-reducción celular desencadenado durante el estrés (Sepulveda et al., 2003).

Como se había mencionado antes *R. centifolia* se utiliza para combatir enfermedades de la piel y vaginales principalmente, sabe que dicha especie es utilizada para limpiarse la cara o zona infectada cada 3 horas aproximadamente y de acuerdo a los resultados obtenidos en la Curva de crecimiento Bacteriano que se realizo sobre *S. aureus* el efecto bacteriostático del extracto MeOH demuestra que el modo de uso es el adecuado para permitir al sistema inmune desencadene el sistema de respuesta contra los microorganismos patógenos, cabe destacar que una de las infecciones mas frecuentes durante la pubertades el acné vulgaris (Hamnerius,1996) la cual es

causada en la mayoría de los casos por *Propionibacterium acnés* y *S. epidermidis*, esta última es capaz de colonizar las unidades sebáceas de la piel creando así el proceso infeccioso (Burkhart et al., 1999), pero para entender el uso de esta planta en heridas fue necesario evaluar la actividad antioxidante, dicha actividad ayuda al proceso de cicatrización, ya que previene el deterioro de células y tejidos producidos por las diferentes especies de oxígeno reactivas, ya que estas son las causantes del proceso inflamatorio (Singh et al., 2006), de tal suerte que *R. centifolia* no solo ayuda a combatir enfermedades infecciosas a nivel tópico, sino que tiene la capacidad de ayudar en el proceso de cicatrización, cabe destacar que es necesario no dejar de lado esta línea de investigación. ya que se sabe que miembros de este género son de gran interés clínico y cosmético (Moure et al., 2001).

CONCLUSIONES

- ✓ El extracto MeOH de *R. centifolia* tuvo mayor rendimiento que su partición hexánica.

- ✓ El extracto MeOH de *R. centifolia* presento actividad antimicrobiana sobre cuatro bacterias Gram positivas, una Gram negativa así como una levadura y un hongo dermatofito.

- ✓ Las fracciones polares presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

- ✓ El extracto MeOH obtuvo una actividad bacteriostática sobre *S. aureus*.

- ✓ El extracto MeOH resultó moderadamente toxico sobre larvas nauplio II de *Artemia salina*.

- ✓ La CL₅₀ de la actividad antioxidante fue de 16.67 mg/mL.

APÉNDICE 1

Rosa centifolia L. Rosaceae

(Argueta y Cano, 1994)

Botánica y ecología

Rosa centifolia es un arbusto de 1 a 2 m de altura, el tallo presenta espinas como agujones, las hojas están divididas en pequeñas hojitas las cuales también tienen espinas, sus flores las podemos encontrar solitarias con muchos pétalos de color rosa fuerte y de olor fragante, los frutos son pequeños y secos (Argueta y Cano, 1994) tal y como se muestra en la figura 1.

Esta es una especie originaria de la región del Cáucaso, está presente en clima semicálido, semiseco y templado desde los 100 hasta los 3900 m snm. *R. centifolia* es cultivada en huertos familiares con fines ornamentales y medicinales, en sitio con vegetación circundante de bosque tropical subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino, de pino y mixto de pino-encino.



Figura 9. Detalle de flor y hojas de *Rosa centifolia*

Etnobotánica y antropología

La rosa de castilla (*Rosa centifolia*) es empleada en diferentes estados del país para la fiebre o calentura. En Guanajuato muelen la flor y la aplican por vía cutánea. Molida en la boca y mezclada con atole blanco de maíz es usada a manera de plantilla en Michoacán. En el Estado de México, preparada en té, sin endulzar o en cocimiento se usa las veces que sean necesarias, para dar un baño general o un lavado rectal. En Oaxaca es recomendada con los mismos fines que en Puebla y Veracruz.

Es empleada para diversos trastornos digestivos como el dolor de estómago causado por andar con los pies descalzos que lo inflama. Se bebe en té preparado con la flor seca, más vainas de tamarindo. De la misma forma se usa para el empacho y las deposiciones ocasionadas por no lavarse las manos o por comer en repugnancia.

Otros usos medicinales para los que se recomiendan incluyen infecciones en cordón umbilical y de la piel, alfericia de niños, anginas, nervios, ardor de ojos, etc.

APÉNDICE 2

Maceración

(Domínguez, 1973)

Las flores de la planta se pusieron a secar en un lugar fresco y ventilado, una vez ya secas se les pesa e introduce en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se les agrega una cantidad de solvente necesaria, donde la planta este cubierta y el líquido esté por encima unos 15 cm aproximadamente, el recipiente es cubierto para evitar la evaporación del solvente.

La planta se deja reposar como mínimo 1 día teniendo en cuenta que la extracción de los compuestos se verá reflejado en la coloración del líquido, entre más oscuro esté mayor rendimiento tendrá la planta.

Por último se realiza una destilación a presión reducida en un rotavapor para obtener el extracto libre del solvente.

APÉNDICE 3

Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.

(Vanden Berghe, D. A. & Vlietink, A. J. 1991)

Medio. Se utilizará como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton, debido a que promueve el desarrollo de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es recomendable que el agar tenga un espesor uniforme en la placa de 4 mm, ya que si este es más fino, el antibiótico tiende a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; y por lo contrario un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Inóculo. Con un asa de siembra estéril se tocaron las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de apariencia semejante. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton, se enjuaga bien el líquido para descargar bien todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo a 37° C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de 1.5×10^8 bacterias/ml.

El estándar No. 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de cloruro de bario a 99.5 ml de H₂SO₄ 0.36 N. La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca, o por medio de espectrofotómetro a 600 nm.

Si la suspensión de los organismos se ve más turbia que el estándar, se agrega solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Posteriormente se sumerge un segundo hisopo estéril y seco en suspensión bacteriana antes de retirarlos se elimina el exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra en estrías en

por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de por lo menos 60° luego de cada estría.

Control positivo. Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con un antibiótico sintético (cloranfenicol 25µg/disco).

Incubación. Ya que las cajas con agar están preparadas para las pruebas de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 35° C, sin mayor tensión de CO₂. Esto es importante ya que el CO₂ puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso en el pH. El desarrollo de microorganismos es inhibido por el pH ácido, lo cual puede provocar una estrechez en la inhibición. Así como la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciendo diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones en las zonas de inhibición.

Interpretación de resultados. Las zonas de inhibición se miden con una regla calibrada en mm. En todos los casos la prueba se realizará por triplicado y los valores promedio se reportaran en mm.

APÉNDICE 4

Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Método de macrodilución en agar (Koneman 1985)

Preparación de reactivos y diluciones:

Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se preparan diluyendo la droga en el agar de Mueller-Hinton según las concentraciones deseadas (0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg). El agar se esteriliza, se deja enfriar y en estado líquido se

coloca la cantidad necesaria del extracto para obtener la concentración requerida. Después de mezclar bien el contenido se transfiere a una caja de Petri.

Inoculación e incubación de los tubos:

Se prepara un inóculo que contiene 10^6 a 10^7 UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0,5 de MacFarland). Incubar los tubos a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo. Con un hisopo se puntean los microorganismos en todas las concentraciones a ensayar

Interpretación de resultados:

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

Determinación de la concentración bactericida media

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en agar. En aquellas cajas en donde, los microorganismos, han sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre matan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1 % del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida media (CBM).

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996)

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica (placas de Elisa). La microplaca se prepara colocando 50 µl de caldo Müller-Hinton con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se prepara una suspensión bacteriana con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml, de esta suspensión se toman 0.1 ml y se le adicionan a 99.9 ml de solución salina al 0.9 % obteniéndose así una concentración de 10^5 bacterias/ml. Cada concavidad se inocula con 50 µl de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 horas a 37 °C, pasado este tiempo se le añaden 50 µl de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08 % a cada concavidad, se incuba por 30 minutos a 37 °C. En las concavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazán de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

APÉNDICE 5

Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento)

(Ávila, 1996)

Se prepara un tubo por lo menos para cada uno de los extractos, para el muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después durante dos horas, durante 5 horas y finalmente a las 24 horas.

Se prepara y rotula un tubo sin antídoto que sirve como control del desarrollo

Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^5 bacterias/ml en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo Müeller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación)

Se inocula con ayuda de una micropipeta 100 μ l de la suspensión de bacterias en los tubos que contendrán los extractos, estos tendrán la concentración de CMI y sus múltiplos medios; esto es, la mitad del CMI y CBM. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 bacterias/ ml de caldo en cada tubo. Se incubará en una estufa sin presión de CO_2

Se muestrea cada hora las primeras 4 horas, después cada dos horas dos tiempos, posteriormente cada cuatro horas dos tiempos y finalmente hasta las 24 horas. La duración del experimento será de 24 a 36 horas.

Se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las "Y" contra el tiempo de incubación del eje de las "X", para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la bacteria, se prolongará la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis y Dulbecco, 1996).

APÉNDICE 6

Método de cultivo de inhibición del crecimiento radial

(Wang y Bun, 2002).

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (100 x 15mm) que contengan 20 mL de agar de papa dextrosa (PDA), en el cual se inocula el micelio del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Si el primer ensayo es con un extracto crudo, se recomienda usar concentraciones grandes de activo (1-2 mg por disco). Los discos se colocan a una distancia de 30mm del límite micelial.

Incubación. Las placas son inoculadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Controles negativos. Discos a los que se les agregara 10 µL del solvente empleando para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que las experimentales).

Controles positivos. Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7 µg/disco de Ketoconazol.

Interpretación de resultados. En el caso de existir zonas de inhibición se reportará el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se hará por triplicado.

Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas de petri (60 x 15), que contengan 6 mL de PDA, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 2.00, 1.50, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL. Posteriormente se coloca una pequeña cantidad de micelio en el centro de la caja.

Incubación. Las placas son incubadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Controles positivos. Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol: 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 3.50, 7.00, 14.00, 28.00 µg.

Interpretación de resultados. Los resultados se reportan en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la Concentración Fungicida Mínima (CFM); mientras que la concentración que representa el 50% de inhibición corresponde a la CF₅₀ y estas están determinadas por regla de tres con respecto al control negativo, el cual representa el 0% de inhibición.

APÉNDICE 7

Método de Toxicidad General

(McLaughlin, 1991)

El ensayo se realiza con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). En frascos de vidrio transparente se colocan 10 ml al 0.5 % de NaCl; posteriormente se colocan 10 larvas por frasco. La concentración del problema a ensayar son 1000, 100 y 10µg/ml.

Control negativo: Como control negativo se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO), solvente empleado para disolver el problema, se emplea el mismo volumen en que se disolvió la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar.

Incubación: Los cultivos se mantienen iluminados (luz blanca) a una temperatura de 23-25 °C durante 24 horas.

Interpretación de resultados: Se cuenta el número de larvas sobrevivientes, las cuales deberán desplazarse de la misma manera que las del grupo testigo.

La concentración letal media (CL₅₀) se determinará para cada extracto interpolándolo en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en mg/ml y a través del análisis de regresión final.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la CL₅₀ se encuentra entre 500 y 1000 µg/mL, cuando se encuentra entre 100 y 500 µg/mL media, y alta entre 0 y 100 µg/mL.

APENDICE 8

Actividad Antioxidante

(Murillo, 2006).

La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-30 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS. En una placa de ELISA se adicionarán 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-30 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 g/mL; inmediatamente se protege de la luz y se mantendrá en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el control negativo fue aplicando 200 µL de metanol en los pozos y como control positivo se usa quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de Resultados

Los resultados fueron reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo

E= Absorbancia del experimental

(Mezcla DPPH + compuesto problema).

REFERENCIAS

1. Aguilar, A. y Camacho, J., R. 1984. **Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas.** Archivos de la investigación Medica. México suplemento. 6:13-14 pp.
2. Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. y Lindequist, U. 2007. **Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Yemen.** Journal of Ethnopharmacology 111, 657-666.
3. Argueta, A., Cano, L. M. 1994. **Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana** Vol. III. Primera edición. Instituto Nacional Indigenista. 1228-1229 pp.
4. Ávila, J. G. 1996. **Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha.** Tesis Maestría en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México. 215 pp.
5. Basim, E., Basim, H. 2003. **Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential Oil.** Fitoterapia 74, 394–396.
6. Bonjar, S. 2004. **Evaluation of antibacterial properties of some medical plants used in Iran.** Journal of Ethnopharmacology 94, 301–305.
7. Burkhart, C. G., Burkhart, C. N. y Lehmann, P. F. 1999. **Acne: a review of immunologic and microbiologic factors.** Journal of Postgraduate Medicine 75, 328-331 pp.
8. Buruk, K., Sokmen, A., Aydin, F., Erturk, M. 2006. **Antimicrobial activity of some endemic plants growing in the Eastern Black Sea Region, Turkey.** Fitoterapia 77, 388–391 pp.

9. Chang, C. y Jeon, J. 2003. **Leaf flavonoids *Cotoneaster wilsonii* (Rosaceae) from the island Ulleung-do, Korea.** Biochemical Systematics and Ecology 31, 171-179 pp.
10. Canales, M., Hernandez, T., Caballero, J., Romo del Vivar, A., Avila, G., Duran, A. y Lira, R. 2005. **Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México.** Journal of Ethnopharmacology 97, 426-439.
11. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, A., Lira, R. 2006. **Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México.** Acta Botánica Mexicana 75, 21-43.
12. Catalano, S., Cioni, P. L., Martinozzi, M., De Feo, V. y Morelli, I. 1995. **Chemical Investigation of *Polylepis incana* (Rosaceae).** Biochemical Systematics and Ecology 23, 105-107 pp.
13. Cowan, M. 1999. **Plant products as antimicrobial agents.** Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology 12, 564-582.
14. Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. **Natural Products (Secondary metabolites).** En: Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. Eds. 2002. Biochemistry and Molecular Biology of plants. American Society of Plants Physiologists. Maryland, USA. 1250-1318 pp.
15. Davis, B. D. y Dulbecco, R., 1996. **Tratado de microbiología, 3° ed.** Ed. Salvat. Editores España. 285p.
16. Dey, P.M., Harborne, J.B. 1989. Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics. Ed. Academic Press. USA. 552 pp.
17. Domínguez, X. A. 1973. **Métodos de Investigación Fitoquímica.** Ed. Limusa. México. 3-17 pp.

18. Franco, D., Pinelo, M., Sineiro, J., Nuñez, M. J. 2007a. **Processing of *Rosa rubiginosa*: Extraction of oil and antioxidant substances.** Bioresource Technology 98, 3506-3512.
19. Franco, D., Sineiro, J., Pinelo, M. y Nuñez, M.J. 2007b. **Ethanollic extraction of *Rosa rubiginosa* soluble substances: Oil solubility equilibria kinetic studies.** Journal of Food Engineering 71, 150-157.
20. Gallardo, V. C. 1985, **Aspectos Etnobotánicos y Bacteriológicos en la Medicina Tradicional en los Altos de Chiapas.** Tesis. ENEP Iztacala. UNAM. México. 211 pp.
21. Gutiérrez, A. I. 1989, **Determinación del efecto antimicrobiano, in vitro, de las plantas de las subclase dicotiledónea, utilizadas popularmente contra la disentería (Causada por *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*).** Tesis de Licenciatura. UNAM, ENEP-Iztacala, México, DF. 61 pp.
22. Hamburguer, M. y Hostettmann 1991, **Bioactivity in Plants: The Link between Phytochemistry and Medicine.** Phytochemistry 30 (12), 3864-3874.
23. Hamnerius, N. 1996. **Acne-aetiology and pathogenesis.** Treatment of Acne 32, 29-38.
24. Harbone, J. B. 1973. **Phytochemical Methods.** Ed. Chapman and Hall. USA.
25. Harbone, J. B. Y Dey, P. M. 1989. **Methods in Plant Biochemistry.** Vol. 1, Plants Phenolics. Ed. Academic Press. USA.
26. Hashidoko, Y., Tahara, S., Mizutani, J. 1989, **Antimicrobial sesquiterpene from damaged *Rosa rugosa* leaves.** Phytochemistry 28 (2), 425-430.

27. Ingraham, J. L., Ingraham C. A. 1998, **Introducción a la Microbiología**. Ed. Reverté. España. 751 pp.
28. Jin, S. y Sato, N. 2003. **Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear *Pyrus spp.*** *Phytochemistry* 62, 101-107 pp.
29. Koneman, W. E. 1996, **Diagnóstico Microbiológico**. Ed. Médica Panamericana, México. 439 pp.
30. Kumarasamy, K., Cox, P. J., Jaspars, P., Nahar, L., Sarker, S. D. 2002. **Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity**. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 73-77.
31. Kumate, J. 1981. **Antibiótico y Quimioterapia**. Ed. Francisco Méndez Hernández. México.
32. Lozoya, L. X., Velázquez, D. G. 1988, **La Medicina Tradicional en México**. Editorial IMSS. México.
33. Martínez, M. 1967, **Las plantas medicinales de México**. Ediciones Botas. 6ª Edición. México. 299-300 pp.
34. McLaughlin, J. L. 1991. **Crow Gall Tumours on Potato disc and Brine Shrimp Lethality: Two simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation**. In: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. (Ed), *Methods in plants Biochemistry assays for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, USA. pp. 1-32.
35. Moure A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M. J y Lema, J. 2001. **Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds**. *Food Research International* 34, 103-109 pp.

36. Murillo, F. 2006. **Actividad antioxidante in Vitro de las bebidas de frutas.** Revista Tecnológica Alfa editores técnicos. 27 pp.
37. Ortiz, D.M.B. 1986. **Aztec sources of some mexican Folk Medicine the art and the science.** American Chemical Society. Stainer R. P. Editor U.S.A.
38. Padmaja, R., Arun, PC. Prashanth, D., Deepak, M., Amit, A., Anjana, M. 2002. **Brine shrimp letality bioassay of selected Indian medicinal plants.** Fitoterapia 73, 508-510.
39. Palacios, L.E., 2005. **Economía y plantas medicinales.** Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, CSI. Boletín 52, 28-32 pp.
40. Pan, C., Chen, J., Lin, T. y Lin, C. 2009. **In vitro activites of three synthetic peptides derived from epinecidin-1 and an anti-lipoplysaccharide factor against *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans* and *Trichomonas vaginalis*.** Peptides 30, 1058-1068.
41. Peña, I. 1976, **Elementos de Observación en la medicina Nahuatl.** En : Estudios sobre etnobotánica y antropología médica. Editorial Libro de México. México. 11 pp.
42. Polunin, M., y Robbins, C. 1992. **The Natural Pharmacy. An Illustrated Guide to Natural Medicine.** Editorial Dorling Kinderley. Alemania.
43. Rahua, J., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kajula, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. y Vuorela, P. 2000. **Antimicrobial effects of Finnish plants extracts containing flavonoids and other phenolics compounds.** International Journal of Food Microbiology 56, 3-12 pp.
44. Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. 2004. **La participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas.** Revista Mexicana de Fitopatología, 355-363 p.

45. Singh, M., Govindarajan, R., Nath, V., Rawat, A.K. y Mehrotra, S. 2006. **Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind.** Journal of Ethnopharmacology 107, 67-72.
46. Strack, D., Eilert, U., Wray, V., Wolff, J. y Jaggy, H. 1990. **Tricoumaroylspermidine in flowers of Rosaceae.** Phytochemistry 29(9), 2893-2896 pp.
47. Thiem, B. y Goslinska, O. 2004, **Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves.** Fitoterapia 75, 93-95.
48. Vanaclocha, B., y Cañigueral, S. 2003, **Fitoterapia. Vandemécum de prescripción.** 4ª Edición. Editorial Masson Doyman. España. 15 pp.
49. Vanden Berghe, D. A., y Vlietinck, A. J. 1991. **Screening methods for antibacterial agents from higher plants.** En: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. 47-71 pp.
50. Wallaart, R. A. 1980. **Distribution of Sorbitol in Rosaceae.** Phytochemistry 19, 2603-2610 pp.
51. Wang, H., y Bun, T. N. 2002. **Isolation o fan antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits.** Phytochemistry 61, 1-6.
52. Wilkes, S. y Glasl, H., 2001. **Insolation, characterization, and systematic significance of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid in Rosaceae.** Phytochemistry 58, 441-449.