



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Efecto antimicrobiano de *Gnaphalium viscosum*, *Pinus patula* y
Plantago major.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

MILLAN FERNANDEZ LIDIA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL

ASESORA: Biól. MARICELA ARTEAGA MEJÍA



México, D.F.

JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	4
Índice de cuadros	5
Índice de graficas	7
Dedicatoria	8
Agradecimientos	9
Resumen	10
Introducción	11
Objetivos	12
Objetivo General	12
Objetivos Particulares	12
Justificación	13
Hipótesis	14
Capítulo I antimicrobiano	15
1.1 ¿Qué es un agente antimicrobiano?	15
1.2 ¿Qué es un patógeno?	16
1.3 Efecto de los agentes antimicrobianos sobre los patógenos	16
1.3.1 Actividad bactericida y su relación con la concentración bactericida mínima (CBM)	16
1.3.2 Actividad bacteriostática y su relación con la concentración mínima inhibitoria (CMI)	16
1.3.3 Breve descripción de los patógenos empleados en este estudio	17
1.3.4 Bacterias	17
a) Gram positiva	17
b) Gram negativas	17
i) <i>Enterococcus faecalis</i>	17
ii) <i>Streptococcus β-hemolitico</i>	18
iii) <i>Streptococcus mutans</i>	18
iv) <i>Staphylococcus aureus</i>	18
v) <i>Streptococcus pyogenes</i>	18
vi) <i>Corynebacterium xerosis</i>	18
vii) <i>Escherichia coli</i>	18
viii) <i>Bacillus subtilis</i>	19
ix) <i>Mycobacterium phlei</i>	19
x) <i>Klebiselia pnemoniae</i>	19
xi) <i>Shigella flexneri</i>	19
1.3.5. Hongos	19
i) <i>Candida albicans</i>	20
ii) <i>Candida krusei</i>	20
iii) <i>Candida tropicalis</i>	20
iv) <i>Criptococcus neformans</i>	20
v) <i>Geotrichum sp.</i>	20
1.4. ¿Qué es antibiograma?	20
1.4.1 Principales métodos para evaluar el efecto antimicrobiano	21
i) Difusión en disco	21
ii) Dilución en tubo	22
1.5 ¿Por qué es importante evaluar la toxicidad?	23
1.5.1 Grados que se pueden evaluar	24
i) Aguda	24

ii) Subaguda o subcrónica	24
iii) Crónica	24
Capítulo II extractos naturales	25
2.1 ¿Qué es un extracto?	25
2.2 Consistencia	25
i) Blandos	25
ii) Firme o de consistencia pilular	25
iii) Secos	26
iv) Fluidos	26
2.3. Origen	26
2.3.1 Naturales	26
2.4 Métodos de obtención de los principios activos	26
i) Discontinuo	26
ii) Extracción mecánica	27
iii) Maceración	27
iv) Digestión	27
v) Infusión	27
vi) Decocción	27
vii) Destilación	27
viii) Tintura	27
2.4.2 Continuo	27
i) Percolación	28
ii) Soxhlet	28
2.5 Análisis de los extractos por Espectroscopia de infrarrojo	28
Capítulo III metabolismo en las plantas.	29
3.1 Primario	29
3.2 Secundario	29
3.3 Principales grupos de los metabolitos secundarios	29
i) Terpenoides o terpenos	30
ii) Fenoles	30
i) Alcaloides	30
3.4 Principales tipos de efectos de los metabolitos secundarios	30
3.5 Descripción y clasificación de las plantas estudiadas	31
3.5.1 <i>Gnaphalium viscosum Kunth</i> (Gordolobo)	31
3.5.1.1 Clasificación científica	31
3.5.1.2 Características botánicas	31
3.5.1.3 Localización	31
3.5.1.4 Usos medicinales	32
3.5.2 <i>Pinus patula Schlechtendal & Cham</i> (pino ocote).	32
3.5.2.1 Clasificación científica	32
3.5.2.2 Características botánicas	32
3.5.2.3 Localización	32
3.5.2.4 Usos medicinales	33
3.5.3 <i>Plantago major L.</i> (Llantén)	33
3.5.3.1 Clasificación científica	33
3.5.3.2 Características botánicas	33
3.5.3.3 Localización	33
3.5.3.4 Usos medicinales	33
3.6 Factores que afectan la producción de los metabolitos secundarios	34
3.6.1 factores endógenos que afectan la producción de metabolitos secundarios	34
i) Mutaciones	34

ii) Poliploidismo	34
iii) Hibridación	35
3.6.2 factores exógenos que afectan la producción de los metabolitos secundarios	35
i) Lluvia	35
ii) Temperatura	35
iii) Altitud y latitud	35
ii) Tipos de suelos	36
Método	37
Fase de campo	37
Fase de laboratorio	37
4. Resultados	42
Antibiogramas del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i>	43
Análisis estadístico de las concentraciones de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i>	48
Antibiogramas del extracto de estróbilos <i>Pinus patula</i> Schl.et Cham	54
Análisis estadístico de las concentraciones de estróbilos de <i>Pinus patula</i>	56
Antibiogramas del extracto de espigas <i>Plantago major</i> L	58
Análisis estadístico de las concentraciones de espiga de <i>Plantago major</i>	60
Resultados de la prueba de toxicidad para el extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i>	64
IR del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> H.B.K	65
IR del extracto de estróbilos <i>Pinus patula</i> Schl.et Cham	67
IR del extracto de espigas <i>Plantago major</i> L	69
5. Conclusiones	72
6. Bibliografía	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Mecanismos sobre los que actúa un agente antimicrobiano	15
2	Actividad bactericida y bacteriostática del agente antimicrobiano	17
3	Resultados que se obtienen con el de difusión en disco	22
4	Presentando como se lleva a cabo la dilución en tubo	23
5	El material que se necesita para realizar el extracto	25
6	<i>Gnaphalium viscosum</i>	31
7	<i>Pinus patula</i>	32
8	<i>Plantago major</i>	33
9	Retirando el disolvente de cada extracto con un rotavapor	38
10	Mediciones que se realizaron en cada halo de inhibición	39
11	Sistema montado para la eclosión de los quistes de <i>Artemia salina</i> Leach, bajo luz continúa	40
12	Difusión en disco del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , para <i>Enterococcus faecalis</i>	45
13	Difusión en disco del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , para <i>Streptococcus β-hemolitico</i>	45
14	Difusión en disco del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , para <i>Streptococcus mutans</i>	46
15	Difusión en disco del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , para <i>Staphylococcus aureus</i>	46
16	Difusión en disco del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , para <i>Streptococcus pyogenes</i>	47
17	Difusión en disco del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i>	47
18	Difusión en disco del extracto estróbilos <i>Pinus patula</i> , para <i>Enterococcus faecalis</i>	55
19	Difusión en disco del extracto estróbilos <i>Pinus patula</i> , para <i>Streptococcus β-hemolitico</i>	55
20	Difusión en disco del extracto espigas <i>Plantago major</i> , para <i>Enterococcus faecalis</i>	59
21	Difusión en disco del extracto espigas <i>Plantago major</i> , para <i>Streptococcus β-hemolitico</i>	60
22	Difusión en disco del extracto espigas <i>Plantago major</i> , para <i>Escherichia coli</i>	60
23	Eclosión de los nauplios vistos a través del estereoscopio	64
24	Pruebas de toxicidad de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> evaluando la concentración de 30 mg/mL	65
25	Espectro de infrarrojo del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i>	66
26	Espectro de infrarrojo del extracto de estróbilos <i>Pinus patula</i>	68
27	Espectro de infrarrojo del extracto de espigas <i>Plantago major</i>	70

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Página
1	Escala turbimétrica de McFarland	39
2	Rendimiento del peso seco de <i>Gnaphalium viscosum</i> , <i>Pinus patula</i> y <i>Plantago major</i>	42
3	Extractos empleados en las pruebas de sensibilidad y bacterias sensibles a estos	43
4	Diferencias y/o semejanzas de las concentraciones del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i>	48
5	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Enterococcus faecalis</i>	48
6	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Enterococcus faecalis</i>	49
7	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Streptococcus β-hemolítico</i>	49
8	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Streptococcus β-hemolítico</i>	49
9	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Streptococcus mutans</i>	50
10	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Streptococcus mutans</i>	50
11	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Staphylococcus aureus</i>	51
12	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Staphylococcus aureus</i>	51
13	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Streptococcus pyogenes</i>	52
14	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Streptococcus pyogenes</i>	52
15	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Corynebacterium xerosis</i>	53
16	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , contra <i>Corynebacterium xerosis</i>	53
17	Diferencias y/o semejanzas de las concentraciones del extracto del extracto de estróbilos de <i>Pinus patula</i>	56
18	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto estróbilos <i>Pinus patula</i> , contra <i>Enterococcus faecalis</i>	56
19	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto estróbilos	56

	<i>Pinus patula</i> , contra <i>Enterococcus faecalis</i>	
20	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto estróbilos <i>Pinus patula</i> , contra <i>Staphylococcus aureus</i>	57
21	Prueba Tukey para las concentraciones del extracto estróbilos <i>Pinus patula</i> , contra <i>Staphylococcus aureus</i>	57
22	Diferencias y/o semejanzas de las concentraciones del extracto del extracto de espigas <i>Plantago major</i>	61
23	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto espigas <i>Plantago major</i> , contra <i>Enterococcus faecalis</i>	61
24	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto espigas <i>Plantago major</i> , contra <i>Enterococcus faecalis</i>	61
25	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto espigas <i>Plantago major</i> , contra <i>Streptococcus β-hemolítico</i>	62
26	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto espigas <i>Plantago major</i> , contra <i>Streptococcus β-hemolítico</i>	62
27	Análisis de varianza para las concentraciones del extracto espigas <i>Plantago major</i> , contra <i>Escherichia coli</i>	63
28	Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto espigas <i>Plantago major</i> , contra <i>Escherichia coli</i>	63
29	Toxicidad de la concentración 30 mg/mL del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> frente <i>Artemia salina</i> Lech.	65
30	Grupos funcionales identificados en los extractos	71

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA		Página
1	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , frente <i>Enterococcus faecalis</i>	49
2	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , frente <i>Streptococcus β-hemolitico</i>	50
3	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , frente <i>Streptococcus mutans</i>	51
4	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , frente <i>Staphylococcus aureus</i>	52
5	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , frente <i>Streptococcus pyogenes</i>	53
6	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> , frente <i>Corynebacterium xerosis</i>	54
7	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto estróbilos <i>Pinus patula</i> , frente <i>Enterococcus faecalis</i>	57
8	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto estróbilos <i>Pinus patula</i> , frente <i>Staphylococcus aureus</i>	58
9	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto espigas <i>Plantago major</i> , frente <i>Enterococcus faecalis</i>	62
10	Tamaño los halos de inhibición por concentración del extracto espigas <i>Plantago major</i> , frente <i>Streptococcus β-hemolitico</i>	63
11	Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto espigas <i>Plantago major</i> , frente <i>Escherichia coli</i>	64

DEDICATORIAS

A mis padres Alberto y Andrea, por su amor, apoyo y comprensión.

A mis hermanos Benito, Beto, Marcos, Dulce y Mariana, por su amor, cariño, apoyo y continuar juntos.

A mi abuelito Basilio por su cariño y apoyo.

A mis tíos Chuy, Geró y Fili, por momentos de convivir, su cariño y por los tiempos difíciles.

A mis tíos Ángela, Rufina, Martín e Isidro, por apoyarnos en los momentos difíciles.

Porque esta meta también es suya, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la maestra María de Jesús Sánchez colín, transmitirme sus conocimientos, su amistad y tener la fortuna de conocer un gran ser humano.

Al equipo de trabajo que está conformado por las maestras M.en C Bárbara Susana Luna Rosales, Biól. Maricela Arteaga Mejía, Biól. Elvia García Santos, Dra. Patricia Rivera García y M. en C Armando Cervantes Sandoval, dedicarle tiempo a la realización de la tesis, su amistad, aconsejarme, saber que con ustedes existe el “sí se puede” y seguir adelante.

A la maestra Angélica Elaine González Schaff y Rodrigo Arturo León Villegas por su amistad, la convivencia en las salidas a campo y la ayuda para el cultivo de la *Artemia*.

A la Dra. Lourdes Castillo Granada del Laboratorio de espectroscopía por la obtención e interpretación de los espectros en el IR.

A mis amigos y compañeros: Paty, Conce, Landy, Andrea, Sergio, Viri, Nayhelli, Claudia, Bere, Diana, Lili, Mireya, Araceli, Lety, Miriam, Miguel Ángel, Anabel, Ricardo, Omar, Fanny, Katy, Cristina, Norma Angélica, Paulina, Anayelli, Gonzalo, Nataly, Erick, Sandra, Ángel, Gloria y Cesar.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial la FES Zaragoza, por permitirme pertenecer a ella, poder realizar este sueño.

A la SEP por el apoyo económico de la beca de titulación.

PROYECTO PAPIME PE204621 y la SEP por la ayuda económica para realizar el proyecto.

A todas las personas que me ayudaron a lo largo de la carrera y la culminación de este escrito, gracias.

Resumen

En el presente estudio se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos de inflorescencias, hojas-tallos de *Gnaphalium viscosum*, estróbilos, acículas-ramas de *Pinus patula* y hojas, espigas de *Plantago major*. A los cuales se realizaron antibiogramas por el método de difusión en disco valoraron las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mg/mL contra 11 bacterias y 5 hongos patógenos del ser humano, pruebas de toxicidad y determinaron los grupos funcionales presentes por examen de infrarrojo.

Los resultados indican que; las bacterias *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β -hemolítico*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium xerosis* fueron sensibles al extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum* a una concentración mínima inhibitoria de 30 mg/mL; *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* fueron sensibles el extracto de estróbilo de *Pinus patula* a la concentración mínima inhibitoria de 60 mg/mL y las espigas de *Plantago major* inhibieron el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β -hemolítico* y *Escherichia coli* a una concentración mínima inhibitoria de 90 mg/mL. Las pruebas con *Artemia salina* L. revelaron que el extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, no es tóxico ya que la mortalidad fue menor al 50%; presentó toxicidad selectiva es inocuo al hospedero.

El análisis estadístico para las concentraciones del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, mostraron diferencia estadística significativa para cuatro bacterias que fueron sensibles y no hubo diferencia significativa para dos bacterias; no hubo diferencia significativa en las concentraciones para las dos bacterias que inhibió el extracto de estróbilos *Pinus patula* y hubo diferencia significativa en las concentraciones el extracto de espigas *Plantago major* en *Enterococcus faecalis*, para las demás bacterias no hubo diferencia significativa en las concentraciones en el extracto de espigas *Plantago major*.

El análisis de infrarrojo para el extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum* mostró la presencia de grupos funcionales amida primaria, alcohol primario y alcano; el extracto de estróbilos *Pinus patula* presento amida primaria, amina secundaria, fenol, alcohol primario, alcano, y el extracto de espigas *Plantago major* presento amida primaria, alcohol primario y alcano.

Introducción

El uso indiscriminado, de antimicrobianos conocidos para atender diversas enfermedades en el ser humano ha llevado a los microorganismos tener resistencia a estos, permitiendo la capacidad de crecer en presencia de las sustancias que antes evitaban su desarrollo.

Para resolver esta problemática se ha llevado a búsqueda de nuevos antimicrobianos determinando el efecto antimicrobiano a partir de extractos de plantas medicinales, diversas instituciones tales como la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Politécnico Nacional y el Instituto Mexicano del Seguro Social, realizan trabajos sobre el tema.

En particular, la tesis realizada por María Isabel Vázquez en 2009, valoró y estableció el efecto antimicrobiano del extracto de *Plantago major* utilizo como disolvente etanol al 50% las bacteria que fueron sensibles Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y Gram negativas *Streptococcus dysenteriae* y *Escherichia coli*.

Así mismo, Sharifa y colaboradores en 2008, valoraron y encontraron efecto antimicrobiano metanol de *Plantago major* contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 100mg/mL y Gram negativas tal como *Escherichia coli* con una concentración mínima inhibitoria de 120mg/mL.

Pinus patula de acuerdo Özkalp y colaboradores en 2009, encontraron efecto antimicrobiano de la resina de *Pinus* especie para las bacterias *Escherichia coli* (Amaya y colaboradores en 2008), *Klebiselia pnumoniae* y *Staphylococcus aureus*, a la concentración mínima inhibitoria de 60 mg/mL, en contraparte Oluwadayo y colaboradores en 2008 encontraron efecto antimicrobiano de *Pinus* especie la concentración de 1000 mg/mL.

Davicino y colaboradores en 2007, encontraron efecto antimicrobiano del extracto de inflorescencias *Gnaphalium* especie (Waizel y colaboradores, 2009), a la concentración minima inhibitoria de 250 mg/mL, en este mismo orden de ideas Ramírez y colaboradores en 2014, reportaron efecto antimicrobiano del extracto *Gnaphalium* especie para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En el presente trabajo se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos de inflorescencias, hojas-tallos de *Gnaphalium viscosum*, estróbilos, acículas-ramas de *Pinus patula* y hojas, espigas de *Plantago major*. Que microorganismos son sensibles a ellos, a que concentración mínima inhibitoria y cuales fueron grupos funcionales que posiblemente dan este efecto.

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto antimicrobiano de los extractos de *Gnaphalium viscosum*, *Pinus patula* y *Plantago major*, en cepas patógenas al ser humano y la concentración mínima inhibitoria a la cual se presenta este efecto, así como los grupos funcionales presentes en diferentes estructuras de las plantas.

Objetivos Particulares

- Obtener los extractos de hojas-tallos e inflorescencias *Gnaphalium viscosum*; acículas-ramas y estróbilos de *Pinus patula*, y hojas, espigas de *Plantago major*, y el rendimiento en peso seco de cada planta.
- Hacer por cada extracto los antibiogramas a través de difusión en disco, para establecer la concentración mínima inhibitoria.
- Determinar el porcentaje de mortalidad en *Artemia salina* L., con cada extracto, para conocer si es tóxico o no.
- Realizar el análisis estadístico de los de los datos, con un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias, para saber si hay diferencia significativa entre las concentraciones.
- Identificar por Espectroscopia de infrarrojo los grupos funcionales presentes en cada extracto de las plantas, empleados en las pruebas para evaluar el efecto antimicrobiano.

Justificación.

El uso indiscriminado, de antimicrobianos conocidos para atender diversas enfermedades en ser humano ha llevado a los microorganismos tener resistencia a estos, permitiendo la capacidad de crecer en presencia de las sustancias que antes evitaban su desarrollo.

Para resolver esta problemática se ha llevado a búsqueda de nuevos antimicrobianos determinando el efecto antimicrobiano a partir de extractos de plantas medicinales, diversas instituciones y universidades de México realizan trabajos sobre el tema.

En el presente trabajo se determinó el efecto antimicrobiano *Gnaphalium viscosum*, *Pinus patula* y *Plantago major*. Que microorganismos son sensibles a ellos, a que concentración mínima inhibitoria y cuales fueron grupos funcionales que posiblemente dan este efecto, para contribuir a nuevos antimicrobianos valorados a partir de extractos de plantas medicinales.

Hipótesis

Las plantas *Gnaphalium viscosum*, *Pinus patula* y *Plantago major*, están reportadas como medicinales para aliviar enfermedades de vías respiratorias, por lo tanto presentarán efecto antimicrobiano los extractos de estas plantas en sepas patógenas del ser humano.

CAPÍTULO I

ANTIMICROBIANO.

1.1 ¿Qué es un agente antimicrobiano?

Se considera agente antimicrobiano a cualquier sustancia química que actúa a bajas concentraciones sobre los microorganismos inhibiendo o eliminando su crecimiento a nivel celular, actuando a nivel de pared, membrana y/o retículo endoplasmático, siendo su principal propiedad mostrar toxicidad selectiva¹. Los agentes antimicrobianos se pueden clasificar según su espectro de actividad, mecanismo de acción y origen (Bailey y colaboradores, 2009).

El espectro de actividad, es la gama de microorganismos contra los cuales un antimicrobiano suele ser eficaz, algunos antimicrobianos tienen un espectro de actividad estrecho cuando el efecto se limita a ciertos microorganismos y otros tienen un espectro de actividad amplio atacando diferentes clases de microorganismos. Por su mecanismo de acción: inhiben la síntesis de la pared celular, del DNA y RNA, la proteica, ácidos nucleicos y alteran la permeabilidad celular (fig. 1). Por su origen los sintéticos se obtienen totalmente por síntesis química y los naturales a partir de plantas medicinales (Fernández y colaboradores, 2009).

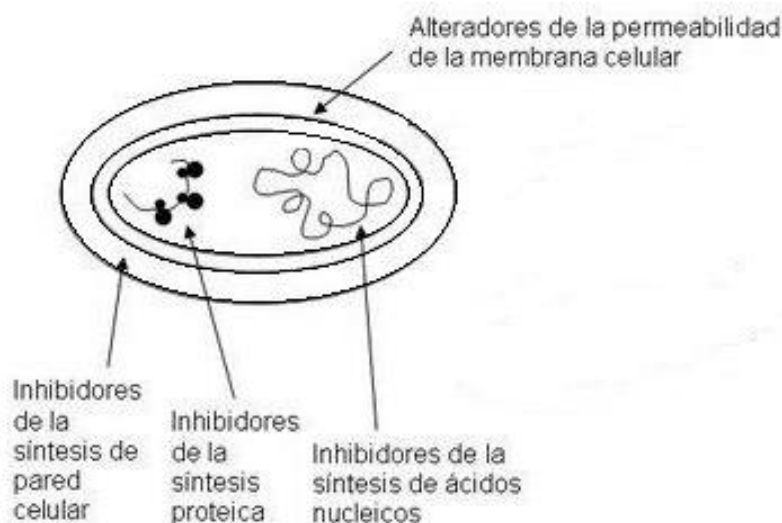


Figura 1. Mecanismos de acción de un agente antimicrobiano (González y colaboradores, 2009).

¹Que sea sensible ante al microorganismo pero inocuo al hospedero y con ello no cause efectos adversos (respuestas alérgicas, daño renal, gastrointestinal o nauseas).

1.2 ¿Qué es un patógeno?

Es un microorganismo capaz de producir enfermedades o daño en el ser humano. Como lesiones en la piel, enrojecimiento y otras más severas que culminan en la muerte del hospedero. Estas enfermedades pueden derivar de diferentes microorganismos tales como bacterias, que son células procariotas muy abundantes que pueden encontrarse en diferentes condiciones del medio, debido a la gran variedad de metabolismo que presentan y los hongos formados por células eucariotas, es decir que poseen núcleo, mitocondrias, membrana y otros rasgos típicos de estas células; los virus debido a su replicación rápida y llegan a combinarse con el núcleo de la célula hospedera su tratamiento suele ser más agresivo (Richard y colaboradores, 2007).

1.3 Efecto de los agentes antimicrobianos sobre los patógenos.

El agente antimicrobiano puede presentar dos efectos sobre los microorganismos patógenos, efecto o actividad bactericida y actividad bacteriostática (fig. 2). La primera se define como el valor de la actividad antimicrobiana que provoca lisis en la pared celular destruye a los patógenos, ejerciendo una acción letal. Se determina *in vitro* enfrentando una concentración estándar de patógenos probándose contra concentraciones del antimicrobiano. La concentración más baja que arrasa el 99% de la población del patógeno se denomina concentración bactericida mínima (CBM). La actividad bacteriostática es el valor de la actividad antimicrobiana que inhibe el crecimiento en un tiempo determinado y no se produce la lisis de los patógenos, llevando a cabo una acción reversible. Se determina *in vitro* enfrentando una concentración estándar de patógenos probándose contra concentraciones del antimicrobiano. La concentración más baja que inhiba el crecimiento de los patógenos se denomina concentración mínima inhibitoria (CMI), (Harvey y colaboradores 2008).



Figura 2. Actividad bactericida y bacteriostática del agente antimicrobiano (Harvey y colaboradores, 2008).

1.3.3 Breve descripción de los patógenos empleados en este estudio

1.3.4 Bacterias

Son células procariotas muy abundantes que pueden encontrarse en cualquier medio debido a la gran variedad de metabolismo que pueden presentar. Según su pared se presentan dos tipos:

a) Gram positivas: se le unen a cuatro ácidos, al L-alanina, D-alanina, D-ácido glutámico y L-lisina.

b) Gram negativas: se caracterizan porque en los peptidoglucanos aparece una capa de liposacáridos y proteínas, esta capa es denominada membrana externa; da un aspecto biestratificado y confiere mayor resistencia a agentes extraños (Carroll, 2008).

i) *Enterococcus faecalis*

Es una bacteria Gram positiva comensal, que habita el tracto gastrointestinal, genitourinario de los humanos y otros mamíferos. Puede causar endocarditis, infecciones en vías urinarias y meningitis (Romero, 2010).

ii) *Streptococcus β-hemolítico*

Los estreptococos son un género de bacterias Gram positivas. Los estreptococos forman parte de la flora saprófita de la boca, piel, intestino y el tracto respiratorio superior de los humanos, causante de neumonía bacteriana, otitis media y meningitis (Carroll, 2008).

iii) *Streptococcus mutans*

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental (Swapan y colaboradores, 2009).

iv) *Staphylococcus aureus*

Conocido comúnmente como estafilococo, es una bacteria anaerobia facultativa Gram-positiva, habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos. Puede producir una amplia gama de enfermedades, tales como conjuntivitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal (Harvey y colaboradores, 2008).

v) *Streptococcus pyogenes*

Es una bacteria Gram-positiva que crece en largas cadenas. En el ser humano habita en la faringe y piel. Es el agente más frecuente del Síndrome de faringoamigdalitis bacteriana, fiebre reumática y glomerulonefritis (González y colaboradores, 2009).

vi) *Corynebacterium xerosis*

Es un género de bacterias, en forma de bacilos y Gram-positiva, inmóviles, anaerobio facultativos, pertenecientes al filo actinobacteria. Son parte de la flora saprófita de la piel humana y las fosas nasales. Causante de enfermedades como neumonía, faringitis, infecciones de la piel y endocarditis (Romero, 2010).

vii) *Escherichia coli*

Es el nombre de un tipo de bacteria que vive en el intestino, gram negativa. Causante de diarrea hemorrágica, a veces puede causar insuficiencia renal y hasta la muerte. Los sitios más frecuentes de la infección clínica son el aparato urinario, vías biliares y otros sitios en la cavidad abdominal (González y colaboradores, 2009).

viii) *Bacillus subtilis*

Es una bacteria gram positiva, viven en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de alimentos que contaminan con su presencia. Puede causar náuseas, vómitos y calambres abdominales (Hewitt, 2004).

ix) *Mycobacterium phlei*

Generalmente se encuentran en muestras ambientales obtenidas de suelos, plantas, aguas, animales y alimentos contaminados, esta bacteria tiene un efecto devastador en países en vías de desarrollo, ya que produce el 95% de los casos de tuberculosis humana (Carroll, 2008).

x) *Klebiselia pnumoniae*

Bacteria Gram-negativa, es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Causa alrededor del 1% de las neumonías de origen bacteriana y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia, algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema (Bailey y colaboradores, 2009).

xi) *Shigella flexneri*

Es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae y pertenece al serotipo B de *Shigella*. Constituyen la principal causa de disentería bacteriana, diarrea caracterizada por eliminación frecuente de heces conteniendo pus, sangre y/o mucus, en ser humano (Keneth, 2005).

1.3.5 Hongos.

Son organismos eucariotas, que poseen núcleo y organelos, carecen de plásmidios por lo que no pueden realizar la fotosíntesis y su pared celular contiene quitina, el tamaño varía considerablemente unos son unicelulares y otros macroscópicos.

i) *Candida albicans*

Este un hongo proviene de la cavidad bucal y de la vagina de mujer (Scott, 2003), causante de algodoncillo candidiasis en el ser humano, endocarditis, otitis, paroniquia y oniquia (Keneth, 2005).

i) *Candida krusei*

Es un hongo, causante de vaginitis y endocarditis (Scott, 2003).

ii) *Candida tropicalis*

Es un hongo, existente como parte de la flora normal humana, causante de oniquia y endocarditis (Keneth, 2005).

iii) *Criptococcus neformans*

Es un hongo que vive tanto en las plantas como en los animales. A menudo se encuentra en los excrementos de las palomas. Causante de meningitis (Carroll, 2008).

iv) *Geotrichum sp.*

Presente en la piel y la mucosa del ser humano. La infección puede ser exógena o endógena causa enfermedades parecida a la tuberculosis, micosis pulmonar y candidiasis en aparato digestivo (Carroll, 2008).

1.4. ¿Qué es antibiograma?

Los agentes antimicrobianos se determinan su efecto mediante pruebas de sensibilidad que se llaman antibiogramas, permiten determinar si el microorganismo es sensible o resistente a un agente.

Un antibiograma consiste en enfrentar un inóculo microbiológico estandarizado a diferentes concentraciones de un agente antimicrobiano tratando en lo posible de reproducir las condiciones del agente infeccioso dentro de los tejidos o los líquidos orgánicos. Esta prueba se emplea para antimicrobianos conocidos o mezcla de ellos y de compuestos orgánicos de origen natural (González y colaboradores, 2009).

1.4.1 Principales métodos para evaluar el efecto antimicrobiano

Los dos principales métodos para evaluar el efecto antimicrobiano son el de difusión en disco y dilución en tubo, estos se fundamentan en un inóculo microbiológico estandarizado que es sometido a un rango de diferentes concentraciones de un antimicrobiano determinado y se clasifican según la técnica para conseguir el rango (Ryan y colaboradores, 2010).

i) Difusión en disco.

Este es un método cualitativo, está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. El método consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Müller Hilton previamente inoculada con el microorganismo, discos impregnados con diferentes concentraciones del antimicrobiano. Tan pronto el disco impregnado con el antimicrobiano, se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antimicrobiano se difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento del microorganismo (fig. 3), (Zaragoza, 2007).

Para que estos resultados sean válidos se deben considerar los siguientes parámetros: tamaño de los discos del antimicrobiano que deben ser de 6 milímetros de diámetro y estériles, tiempo de incubación, 24 horas para bacterias y 48 horas para hongos y los medios de cultivos agar Sabourand para bacterias y Müller Hilton para hongos, la técnica de incubación o de Barry, consiste en la estandarización del inóculo microbiológico se utiliza la escala turbimétrica o escala de McFaland, cuyo principio es formar un precipitado de color blanco llamado sulfato bórico, mezclando cloruro bórico al 1% y ácido sulfúrico al 1%, así la muestra tendrá la misma concentración del tubo uno de escala de McFaland, esta será aproximadamente de 3×10^8 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) (Zaragoza, 2007).

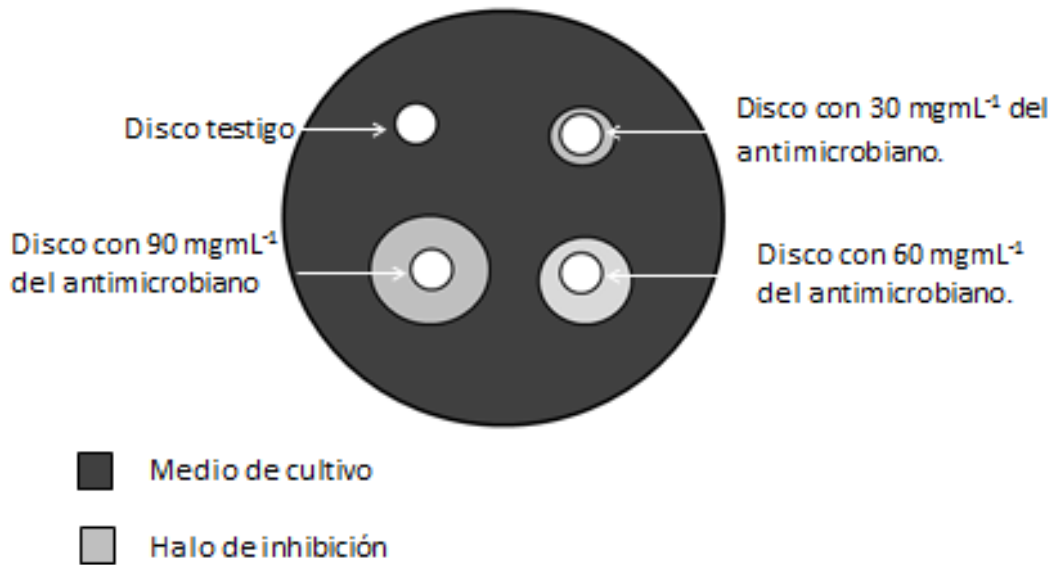


Figura 3. Resultados que se obtienen con el método de difusión en disco (Bailey y colaboradores, 2009).

ii) Dilución en tubo.

Los métodos de dilución en tubo (fig.4), son la base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un medio de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El medio de cultivo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller-Hilton. Los agentes antimicrobianos se preparan en solución inicial y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas. Luego de la incubación se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. El tubo donde no hay crecimiento de los microorganismos es el que se toma en cuenta en esta técnica (Carroll, 2008).

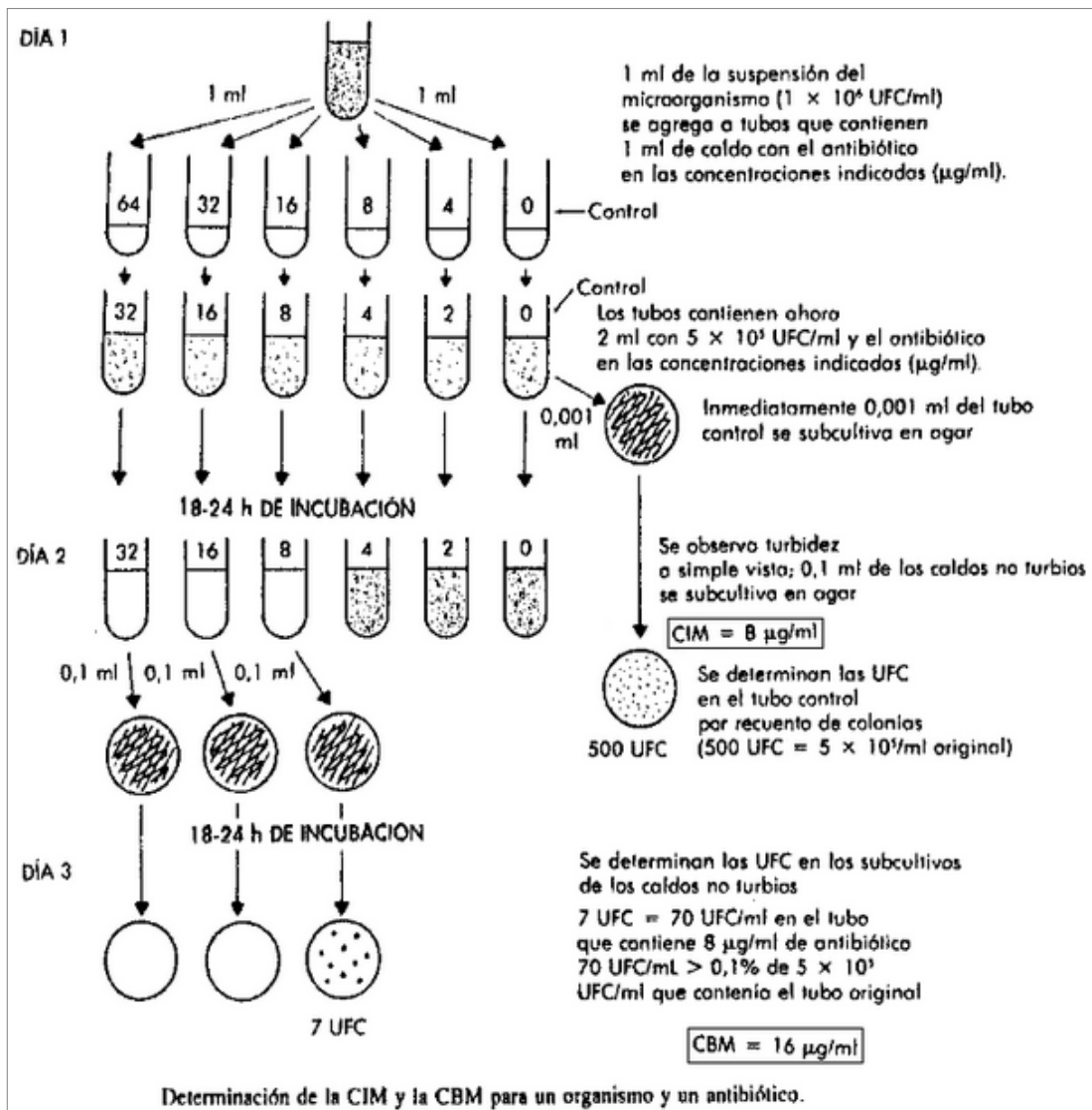


Figura 4. Presentando como se lleva a cabo la dilución en tubo, (Carroll, 2008).

1.5 ¿Por qué es importante evaluar la toxicidad?

Un agente antimicrobiano debe mostrar toxicidad selectiva, es por esto que se evalúa sus efectos adversos o tóxicos para que no se presenten daños en la salud del ser humano y existen diversos grados de toxicidad, estos dependen del tiempo de la aplicación de la dosis, de la concentración mínima inhibitoria y el lapso de tiempo en que se quieren observar los efectos que cause a los animales de experimentación, estos son: aguda, subaguda y crónica (Fernández y colaboradores, 2009).

1.5.1 Grados que se pueden evaluar

i) Aguda

Son ensayos que se realizan a corto plazo de forma prácticamente inmediata generalmente por administración de una dosis a animales de experimentación.

- a) Dosis mortal mínima : Cantidad de droga y principio activo necesaria para matar un kilogramo de animal.
- b) Dosis letal media o dosis letal 50 (DL₅₀): Cantidad de droga o principio activo necesario para producir la muerte de la mitad de los animales de experimentación a los que se administró la dosis.

ii) Subaguda o subcrónica

Son ensayos que se realizan a mediano plazo, generalmente a 30 días pero también en muchos casos a 90. Se administran dosis terapéuticas y trascurrido el periodo de tiempo se evalúa los posibles casos de intoxicación.

iii) Crónica

Son ensayos que se realizan a largo plazo, en periodos que pueden oscilar entre varios meses y tres años. Se administran dosis terapéuticas de forma continuada. La principal finalidad es evaluar posibles efectos teratogénicos, carcinógenos y mutagénicos (Zepeda, 2012).

CAPÍTULO II

EXTRACTOS NATURALES.

2.1 ¿Qué es un extracto?

Son sustancias obtenidas por concentración parcial o total de los líquidos extractivos. Esto se basa en la solubilidad de los compuestos orgánicos presentes, comúnmente son insolubles en agua pero solubles en disolventes no polares, tales como acetona, hexano, cloroformo mezcla de ellos, diversos autores mencionan que han tenido buenos resultados en alcohol (fig. 5). Existen diversos métodos de extracción, para llegar a un proceso de extracción adecuado. Se distinguen diferentes extractos según su consistencia (extractos blandos, firmes o de consistencia pilular, secos y fluidos). Por su origen, los naturales (Lazcano y colaboradores, 2008).

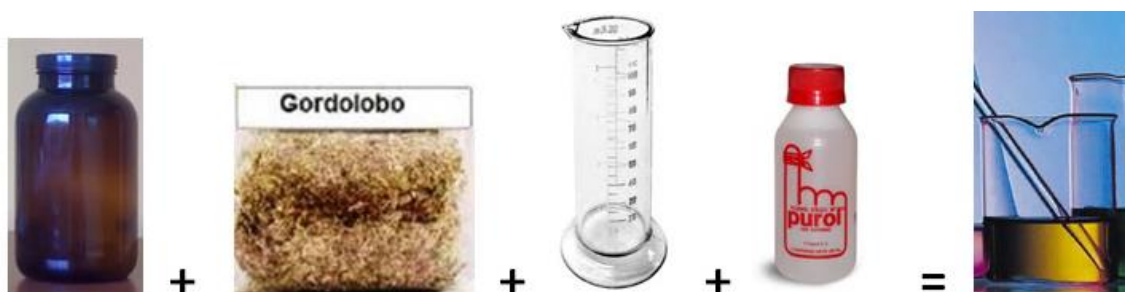


Figura 5. Material necesario para obtener un extracto.

2.2. Consistencia.

i) Blandos

Tienen una consistencia espesa o densa, parecida a la miel.

ii) Firmes o de consistencia pilular

Como su nombre lo indica tienen una estrecha semejanza con la masa con la que se fabrican o manufacturan las píldoras; su estado físico son sólidos, el color depende de la materia prima de la que están hechos y deben tener la característica especial de no adherirse.

iii) Secos

Son extractos en los cuales el disolvente se ha eliminado. Son polvos, de fácil manipulación y dosificación.

iv) Fluidos

Se preparan en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, secada al aire y pulverizada (Lazcano y colaboradores, 2008).

2.3. Origen

2.3.1 Naturales

Se obtienen a partir de las plantas, que contienen en sus estructuras, alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos, por ejemplo, para prevenir o curar enfermedades, estas pueden ser utilizadas frescas o secas dependiendo de la química de los grupos orgánicos (Martínez y colaboradores, 2010).

2.4 Métodos para obtención de principios activos

La literatura refiere varios métodos para obtener los metabolitos secundarios de las plantas, los cuales son sencillos y tiene ciertas ventajas, como permitir la buena conservación, se pueden ajustar el contenido de principio activo y concentrar los metabolitos secundarios eliminando los disolventes. Los principales métodos extractivos partir de la planta son el discontinuo y continuo.

i) Discontinuo

En el método discontinuo o simultáneo las estructuras de las plantas se sumergen en un disolvente, la extracción y la difusión de los principios activo se producirá en todas direcciones hasta alcanzar el equilibrio. La extracción discontinua puede seguir varios procedimientos como son:

ii) Extracción mecánica

Es una técnica que permite obtener los metabolitos secundarios disueltos en los fluidos propios de la planta, a esto se le llama jugo.

iii) Maceración

Las estructuras de las plantas se trituran y se colocan en contacto con un disolvente a temperatura ambiente. Se debe mantener la agitación durante un tiempo determinado, como disolvente se puede utilizar glicerina o mezclas hidroalcohólicas.

i) Digestión

Es similar al método extractivo de maceración pero a temperaturas elevadas.

ii) Infusión

Se utiliza agua llevando a punto de ebullición, posteriormente se colocan las estructuras de la planta y se deja enfriar a temperatura ambiente.

iii) Decocción

Proceso de cocción, llevando las estructuras de la planta junto con el agua a punto de ebullición durante 15-30 minutos.

iv) Destilación

Esta técnica se basa en la volatilidad de los componentes de las estructuras de las plantas lo cual permite la separación de los componentes volátiles de otras.

v) Tintura

Se utiliza alcohol etílico. La planta machacada, triturada, finamente cortada o en polvo se coloca en un frasco de vidrio ámbar. Se le añade alcohol etílico absoluto (96°). Se tapa bien y se deja reposar durante 15 días agitando diariamente. Se filtra y guarda en lugar fresco y seco.

2.4.2 Contínuo

Para el método contínuo el disolvente utilizado se renueva y activa en una sola dirección; se pueden realizar los siguientes procedimientos.

i) Percolación

Se realiza a temperatura ambiente, colocando las estructuras de la planta en una columna, donde el disolvente este en contando con ella por goteo.

ii) Soxhlet

Se utiliza un extractor Soxhlet para realizar una extracción sólido-líquido.

2.5 Análisis de extractos por Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo es un método físico de análisis, sencillo de realizar, específico y confiable, este aparato abarca la región de 600 a 4000 cm^{-1} longitud de onda , la aplicación del infrarrojo en laboratorio sirve para identificar sustancias orgánicas en su momento dipolar, para sólidos, líquidos y polímeros, se puede utilizarse para fines cualitativos y cuantitativos (Pradeau, 2001). La información obtenida desde un espectro de infrarrojo permite la identificación de grupos funcionales presentes, los cuales son la estructura más simple de los compuestos orgánicos, para ello se utilizan tablas de correlación dividiéndose en la región fundamental de 4000 a 1300 cm^{-1} y verificando con la región de huellas digitales 1300 a 600 cm^{-1} (Gutiérrez y colaboradores, 2009; Zepeda, 2012).

Los extractos son obtenidos a partir de plantas medicinales, que provienen del metabolismo secundario, forman los metabolitos secundarios del cual se tiene el principio activo que es el dan el efecto terapéutico; a continuación se describe a detalle.

CAPÍTULO III

METABOLISMO EN LAS PLANTAS.

Las plantas medicinales son capaces de manufacturar alimentos a partir de sustancias químicas simples por medio de la fotosíntesis. En ellas está presente el metabolismo, el cual se define como la suma de todas las reacciones químicas que ocurren en el organismo viviente; comprende la elaboración de nutrientes, su transformación, la energía liberada en ellos, tales reacciones se encargan de mantener la viabilidad del organismo, este se divide en primario y secundario.

3.1 Primario

Se presenta a partir de la fotosíntesis tiene funciones esenciales como la respiración, transportes de solutos, la traslocación, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes, la diferenciación de tejidos. De este se obtienen los metabolitos primarios; dentro de ellos se encuentran ciertos compuestos orgánicos: azúcares, aminoácidos, ácidos grasos comunes, nucleótidos y polímeros derivados de ellos por ejemplo, polisacáridos, proteínas, lípidos, DNA y RNA. Estos compuestos poseen una distribución universal (Azcon, 1993).

3.2 Secundario

Se generan compuestos químicos que no poseen una distribución universal y no cumplen con funciones esenciales e intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, como disuasivo para que la planta no sea comida, generalmente sirven como defensa contra herbívoros como insectos, moluscos, vertebrados y microorganismos como bacterias, hongos y virus; estos tienen actividades ecológicas como la dispersión y polinización de semillas, o protección contra rayos ultravioleta. A partir de ellos se forman el principio activo, que es la sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico (Yasaki y colaboradores, 2008).

3.3 Principales grupos de los metabolitos secundarios

Con base en sus orígenes biosintéticos, los metabolitos secundarios se dividen en tres grupos:

i) Terpenoides o terpenos

Constituye la clase más grande de metabolitos secundarios, con más de 25,000 compuestos. Los terpenoides se forman a partir de difosfatos fenol de diferente longitud de cadena, por el alargamiento consecutivo de unidades de isopreno de cinco carbonos, tales como difosfato de dimetilalilo y difosfato de isopentenilo, formando hemiterpenos (Yasaki y colaboradores, 2008).

ii) Fenoles

Están representados por sus estructuras de anillos aromáticos que contienen más de un residuo de fenol. Estos compuestos, pueden clasificarse en compuestos fenólicos simples, incluyendo fenilpropanos, lignanos, xantenos, flavonoides, taninos y como polímeros de polifenoles que se clasifican en dos tipos, hidrolizables o condensados. Desde el punto de vista del transporte, los flavonoides se han estudiado intensamente. Son una de las mayores clases de compuestos fenólicos con más de 7,000 compuestos, que están implicadas en las interacciones patógeno de plantas y la protección luz ultravioleta, y también en la variación de color de la flor (Yasaki y colaboradores, 2008).

iii) Alcaloides

Son compuestos que contienen nitrógeno orgánico de bajo peso molecular, sobre todo son los metabolitos aromáticos. Hasta la fecha, se han encontrado aproximadamente 12,000 compuestos alcaloides, y de estos, la quinta parte en plantas; tienen una amplia variedad de estructuras químicas y actividades biológicas. Debido a sus propiedades bioactivas, los alcaloides son a menudo secuestrados en las vacuolas de las células vegetales para evitar efectos tóxicos. Muchos estudios se han llevado a cabo para caracterizar el mecanismo de acumulación vacuolar de alcaloides utilizando cultivos de células, protoplastos. La mayoría de los alcaloides son tóxicos en dosis elevadas y en algunos casos dicha dosis es mínima.

Tanto de los terpenoides o terpenos, fenoles y alcaloides se deriva una extensa gama de compuestos orgánicos presentes en las plantas medicinales (Yasaki y colaboradores, 2008).

3.4 Principales tipos de efectos de los metabolitos secundarios.

Muchos de ellos tienen importantes aplicaciones terapéuticas, por su actividad farmacológica como inmunosupresores, antiinflamatorios, cardiotónicos, inhibidores enzimáticos y

antimicrobianos. De acuerdo a Grayer y Harborne (1994), los compuestos antimicrobianos pertenecen a tres principales clases de compuestos secundarios (terpenos, fenoles y alcaloides); (López, 2011).

3.5 Descripción y clasificación de las plantas estudiadas.

3.5.1 *Gnaphalium viscosum* Kunth (Gordolobo)

3.6.1.1 Clasificación científica

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Compositae

Género: *Gnaphalium*

Especie: *Gnaphalium viscosum*



Figura 6. *Gnaphalium viscosum*.

3.5.1.2 Características botánicas

Hierba anual o bianual, de 20 a 80 cm de alto; tallos de 20 a 80 cm de alto; tallos simples o medianamente ramificados, por lo general densamente ramificados, hojas con el haz verde y el envés blanco, lámina más ancha hacia su base, con forma semejante a una punta de flecha, de 1.5 a 8 cm de longitud y de 1 a 5mm de ancho; inflorescencias, panículas de 20 cm de longitud formadas por cabezuelas que contienen 200 flores o más; flores de 5 a 6 mm de longitud, amarillentas o blanco-amarillentas.

3.5.1.3 Localización

Presente en clima templado entre los 1900 y los 2860 msnm. Crece en áreas de vegetación perturbada de matorral xerófilo, bosques de pino, de encino, mixto de encino-pino y de pino-encino.

3.5.1.4 Usos medicinales

En algunos estados del centro de la República Mexicana se usa la inflorescencia de *Gnaphalium viscosum* (fig. 6), (Waizel y colaboradores, 2009) en infusión para curar la tos. La medicina tradicional mexicana le atribuye propiedades antitusivas y descongestionante de las vías respiratorias. Por otra parte, la infusión de la planta preparada junto con hojas de encino (*Quercus sp*), sirve para aliviar el dolor de estómago. Las ramas y hojas se ocupan para el empacho. Se le atribuyen propiedades como expectorante, en ella se han revelado la presencia de saponinas, taninos y terpenos, (Mata, 2015).

3.5.2 *Pinus patula* Schlechtendal & Cham (pino ocote).

3.5.2.1 Clasificación científica

Reino: Plantae

División: Pinophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Pinácea

Género: *Pinus*

Especie: *Pinus patula*



Figura 7. *Pinus patula*.

3.5.2.2 Características botánicas

Árbol de 12 a 25 m de altura, a veces más de 30, con la corteza rojiza y escamosa. Hojas en fascículos de 3 como número más constante; con la vaina persistente miden 15-30cm de largo, delgadas, colgantes como flocos. Conos largos, cónicos, duros, reflejos, en grupos de 3-6, escamas pétreas, con el ápice redondeado, de color café amarillento, hasta rojizo. Semillas triangulares, cuya ala mide de 12-14 mm de longitud. Madera poco resinosa, de color claro o amarillento.

3.5.2.3 Localización

Originaria de México. Habita en clima templado entre los 1000 y los 2600 msnm. Asociada a bosque mesófilo de montaña, constituye bosques de pino y mixto de pino-encino.

3.5.2.4 Usos medicinales

Esta especie se utiliza en Amecameca estado de México para tratar ciertos malestares respiratorios como la tos. De *Pinus patula* (fig. 7) las estructuras estudiadas son las acículas, en ellas se han identificado los terpenos, taninos y flavonoides (Mata, 2015).

3.5.3 *Plantago major* L. (Llantén)

3.5.3.1 Clasificación científica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Plantaginaceae

Género: *Plantago*

Especie: *Plantago major*



Figura 8. *Plantago major*.

3.5.3.2 Características botánicas

Planta anual o perenne, de 10 a 30 cm de altura, con pequeños camotes. Tiene las hojas en roseta (surgen desde el nivel del suelo), envolviendo parte del tallo. Las inflorescencias son diminutas y de color blanco-verdosas, acomodadas en una espiga central y larga, dando la apariencia de una mazorca delgada, las semillas son de color café. Es originaria del Norte de Europa y Centro de Asia. Presente en climas cálido, semicálido y templado, desde el nivel del mar hasta los 3500 m.

3.5.3.3 Localización

Planta asociada a terrenos de cultivo, bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo.

3.5.3.4 Usos medicinales

Plantago major (fig. 8) es utilizado para padecimientos relacionados con el aparato digestivo, en el tratamiento de la disentería y diarrea. También se le reconocen propiedades contra las enfermedades de las vías respiratorias como faringitis, laringitis y bronquitis. Particularmente las hojas, han sido las estructuras más estudiadas de esta planta desde el punto de vista químico. Y en ellas se han encontrado mucilagos, pectinas, flavonoides y taninos (Mata, 2015).

3.6 Factores que afectan la producción de los metabolitos secundarios

Estos factores son internos, ocurren dentro de la planta y llegan la producción alta o baja de compuestos orgánicos dependiendo del factor, los externos son la influencia del medio con la planta en particular, tienen influencia en la formación de aceites esenciales, saturados y no saturados y el rendimiento de estos compuestos.

3.6.1 Factores endógenos que afectan la producción de los metabolitos secundarios

Estos ocurren dentro de la planta son de origen genético, como ejemplos se pueden mencionar.

i) Mutaciones

La exposición a radiaciones ionizantes (rayos X, gama, radiactividad), o no ionizantes (rayos UV y ciertos agentes mutagénicos) algunas veces se presenta una variación en la naturaleza de un gen, obteniéndose una mutación que puede cambiar la morfología o la naturaleza bioquímica de una planta.

ii) Poliploidismo

Es un aumento en el número de cromosomas sin reducción previa. Se puede alcanzar por medios naturales o artificiales, por tratamientos generalmente con calor o colchicina u otros agentes. El aumento del número de cromosomas puede causar cambios en la constitución del individuo hijo. Puede cambiar el tamaño de la planta o sus órganos, aunque también, puede haber cambios fisiológicos.

iii) Hibridación

Consiste en cruzar individuos de diferentes especies para producir una progenie híbrida. Así, pueden introducirse modificaciones deseables morfológicas y bioquímicas. Pueden introducirse genes que le den resistencia.

3.6.2 Factores exógenos que afectan la producción de los metabolitos secundarios

Estos se deben al efecto que tiene el ambiente en la planta, ejemplos de ellos son:

i) Lluvia

Los efectos que ejerce la lluvia requieren que se tenga en cuenta en relación con la lluvia anual, su distribución a lo largo del año, su influencia sobre la humedad y sus efectos relacionados con las propiedades de retención de agua en el suelo. Una lluvia continua puede llegar a la pérdida de sustancias hidrosolubles de las hojas y raíces por maceración hecho conocido y aplicado a algunas plantas productoras de alcaloides (ejemplo Solanáceas), heterósidos o esencias.

ii) Temperatura

La temperatura es un factor de gran importancia en el control del desarrollo y metabolismo de las plantas. Aunque cada especie ha llegado adaptarse a su propio entorno natural, las plantas pueden ser capaces de vivir dentro de una considerable variación de temperaturas. Muchas plantas tropicales y subtropicales crecen en regiones templadas durante los meses de verano, pero carecen de resistencia frente a las heladas para aguantar el invierno. En general, las temperaturas más elevadas se registran cerca del Ecuador, pero como la temperatura disminuye aproximadamente 1°C por cada 200 m de altitud, es posible, tener un clima tropical en la costa y otra temperatura en las montañas. En particular la formación de esencias parece elevarse con temperaturas altas, aunque en días muy cálidos pueden producirse una excesiva pérdida de ellas.

iii) Altitud y latitud

El efecto de la latitud es importante para la producción de grasas por la planta. Las plantas tropicales poseen una mayor cantidad de ácidos grasos saturados que los de las plantas de climas subtropicales. Así el ácido oleico predomina en el aceite de oliva, maní, almendra y sésamo. La máxima insaturación aparece en grasas de plantas de clima frío (aceite de lino).

Cuando una misma planta crece en varias latitudes los aceites resultantes tienen diferente insaturación.

iv) Tipos de suelos

Las especies vegetales varían enormemente en cuanto a sus requerimientos de suelos y de nutrientes. Este aspecto ha sido objeto de considerable atención respecto a las plantas medicinales. El suelo es otro factor que influye con la planta y por consecuencia los metabolitos secundarios. Tres son las importantes características básicas del suelo: las físicas, químicas y microbiológicas.

El tamaño de las partículas es un factor que influye en la capacidad de retención de agua, y ciertas plantas por ejemplo *Althaea officinalis* produce mucílagos como producto que retiene agua, cuando esta planta crece sobre un suelo de alto contenido en humedad el mucilago es menor.

El suelo arenoso, pobre en humus y con un subsuelo de grava, son generalmente útil para plantas xerófilas. Sobre el suelo calcáreo pobre en humus, la vegetación es de tipo marcadamente xerófilo; en cambio, si existe humus se incrementa el poder de absorción de humedad. El suelo muy rico en humus y con poco limo tiende a hacerse ácido, mientras que el que posee limo abundante es alcalino (Trease y colaboradores, 1991).

MÉTODO

Consistió en tres fases: fase de gabinete se realizó la búsqueda y selección de la información; fase de campo se colectó el material vegetal y herborizo para tener un ejemplar de las plantas que se estudiaron en el herbario de la FES Zaragoza y en la fase de laboratorio, se procesó el material vegetal, realizó las pruebas de difusión en disco si hubo o no efecto antimicrobiano.

Fase de campo

Para la colecta se consideraron los siguientes criterios, que las muestras de material vegetal fueran representativas de la zona de estudio para ello, se delimitó en cuadrantes de 20 metros por 30 metros, además el material vegetal estuviera en buen estado y que no presentara residuos de material edáfico, ya que de lo contrario los extractos se pueden contaminar con microorganismos.

Para *Pinus patula*, en Amecameca cerca del Parque nacional Izta-popo los pobladores utilizan los estróbilos (son las estructuras de los conos inmaduros) para curar enfermedades de vía respiratorias y se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos de estróbilos, acículas-ramas de *Pinus patula* que crece en los jardines de la FES Zaragoza campo II.

Las especies *Gnaphalium viscosum* y *Plantago major* están reportadas como medicinales en la zona del parque Parque Nacional Izta-popo, en particular las inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, combaten enfermedades de vías respiratorias; *Plantago major* solo están reportadas las hojas para aliviar enfermedades respiratorias y digestivas, se valoró su efecto antimicrobiano de las inflorescencias, las hojas-tallos de *Gnaphalium viscosum* y las espigas y hojas de *Plantago major* que crecen el Bosque de *Abies religioso* parque Parque Nacional Izta-popo.

Fase de laboratorio

Preparó el material vegetal separándose en inflorescencias, hojas-tallos de *Gnaphalium viscosum*: estróbilos, acículas-ramas de *Pinus patula* y espigas, hojas de *Plantago major*; estas estructuras se lavaron con agua de la llave, después se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% y enjuagaron con agua destilada, posteriormente se secaron.

Después el material vegetal se cortó en trozos pequeños para facilitar el proceso de extracción de la mezcla del principio activo, fueron separados como se comentó anteriormente y se agregaron a un frasco ámbar, se añadió alcohol hasta cubrirlos.

Se quitó el exceso de disolvente de cada extracto con en un rotavapor (fig. 9), para obtener del rendimiento en peso seco de los extractos.



Figura 9. Eliminación del disolvente de cada extracto con un rotavapor.

Posteriormente se prepararon las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg/mL por extracto, previamente con una perforadora se cortaron círculos con un diámetro de 6 milímetros de papel Watman No 41 y fueron esterilizados en autoclave a 120 lb/pg² durante 20 minutos. Por cada concentración se empleó una caja Petri, se colocaron con una pinza 30 discos y se impregnaron con una pipeta de 1mL la concentración respectiva se realizó tantas veces como las concentraciones se propusieron. En otra caja Petri se colocaron 30 discos y se sumergieron solo con alcohol estos como testigos, se realizó en la campana para mantener las condiciones de asepsia. A partir de las concentraciones, se probaron los microorganismos patógenos y se determinó por extracto la concentración mínima inhibitoria.

Para la estandarización del el inóculo microbiológico se preparó anticipadamente una solución salina (NaCl 0.1%) se igualó la turbidez del tubo 1 de la escala de Mac-Faland (cuadro 1), para saber qué cantidad de microorganismos crecieron en los antibiogramas (Mc Faddin, 2004).

Cuadro 1. Escala turbimétrica de McFarland.

No. de tubo	BaCl ₂ 1 % mL	H ₂ SO ₄ 1% mL	No. aprox. de bacterias por 10 ⁶ /mL
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

Consecutivamente se elaboraron los antibiogramas por el método de difusión en disco de los extractos inflorescencias, hojas-tallos de *Gnaphalium viscosum*; espigas y hojas de *Plantago major*; hojas y estróbilos, acículas-ramas de *Pinus patula*; se evaluaron las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg/mL, se mantuvieron en la estufa a 28°C; para bacterias durante 24 horas, el medio de cultivo Agar Mueller-Hilton; hongos durante 48 horas como medio de cultivo Agar Sabourand, con cinco repeticiones por microorganismo y se incluyó un testigo impregnado con alcohol, a cada halo de inhibición realizaron cuatro mediciones con un Vernier de acuerdo a las manecillas del reloj (fig. 10), el promedio de estos se reportaron en milímetros dado que en ocasiones el diámetro del halo de inhibición es irregular.

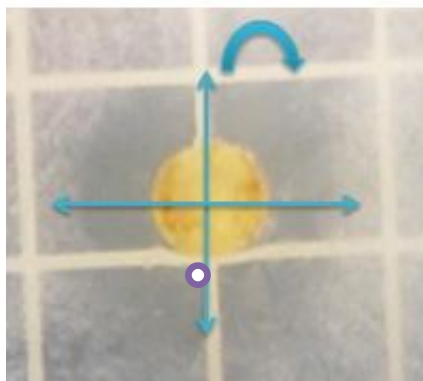


Figura 10. Mediciones que se realizarón en cada halo de inhibición.

Pruebas de toxicidad

Se empleó como material biológico quistes de *Artemia salina* Leach, los cuales se pusieron a eclosionar en un recipiente, en el que anteriormente se había preparado una solución salina al 35% se usó sal de mar, a temperatura ambiente bajo luz continua y con oxigenación (fig. 11), se agregaron en un frasco estéril 50 mililitros de la solución, 50 nauplios de *Artemia salina* y la concentración mínima inhibitoria de cada extracto, se realizaron 5 repeticiones por concentración y se incluyó un frasco como testigo, que solo contenía 50 artemias y 50 mililitros de solución, después de 24 horas se registró el número de artemias muertas y se valoró la dosis letal media calculando el porcentaje de mortandad (Fernández y colaboradores, 2009). Se evaluó la dosis letal media para determinar si los extractos (inflorescencias, hojas-tallos de *Gnaphalium viscosum*; estróbilos, acículas-ramas *Pinus patula* y espigas, hojas de *Plantago major*, que se evaluó el efecto antimicrobiano) fueron tóxicos o no. A continuación se presenta la fórmula que se utilizó para calcular el porcentaje de mortandad.

$$\%M = \left(\frac{\text{artemias muertas con el extracto después de 24 horas}}{\text{artemias vivas en el testigo}} \right) * 100$$



Figura 11. Sistema montado para la eclosión de los quistes de *Artemia salina* Leach, bajo luz continúa.

De cada extracto seco se tomó una muestra con una espátula y se colocó en un cubre objetos dejando una película, se etiquetó con el nombre científico de la planta y la estructura. Cada muestra se sometió al espectrofotómetro de Infrarrojo con transformadas de Fourier, se obtuvieron los espectros IR, con apoyo de las cartas de correlación se asignaron los grupos funcionales y sus asociaciones, posteriormente se revisó en la literatura el posible efecto terapéutico de estos.

Por último, el análisis estadístico de los datos, a través del software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XV, se realizó un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, para saber si existía diferencia significativa en los tratamientos (Cervantes y colaboradores, 2006).

4. Resultados

En el cuadro 2 se registró mayor rendimiento del extracto de *Gnaphalium viscosum* de 36.6 g se tuvo el rendimiento de 1.7 %, indicando que se necesita menor cantidad de material vegetal para obtener el extracto, en contraste el extracto de estróbilos de *Pinus patula* de 452.6g se obtuvo el rendimiento de 4.7 %, con base a lo anterior se necesita grandes cantidades de material vegetal para preparar el extracto.

Cuadro 2. Peso seco de los extractos *Gnaphalium viscosum*, *Pinus patula* y *Plantago major*.

Estructuras y planta medicinal	Peso estructuras (g)	Peso seco extracto (g)	Rendimiento (%)
Espigas <i>Plantago major</i>	114.2	8.96	7.8
Estróbilos <i>Pinus patula</i>	452.2	7.8	4.7
Inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i>	36.6	0.65	1.7

En el cuadro 3, se observa que tres extractos presentaron efecto antimicrobiano, mayor efecto en el extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, para este primero se analizaron las concentraciones de 30, 60 y 90 mg/mL, fueron sensibles a *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β-hemolítico*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*; después se decidió incrementar las concentraciones, por ello se analizaron las concentraciones de 60, 90 y 120 mg/mL, que inhibió a *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium xerosis*. Con base a lo anterior, este extracto presentó efecto antimicrobiano a bajas concentraciones. En contra parte, el extracto de espigas de *Plantago major* mostró menor efecto a las concentraciones 90, 120, 180 y 250 mg/mL, ya que inhibió el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β-hemolítico* y *Escherichia coli*, el cual presentó efecto antimicrobiano a altas concentraciones. Los extractos en estudio no inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos del hombre.

Cuadro 3. Extractos empleados en las pruebas de sensibilidad y bacterias sensibles o resistentes a estos.

Nombre científico	<i>Gnaphalium viscosum</i> inflorescencias				<i>Pinus patula</i> estróbilos			<i>Plantago major</i> espigas			
	30	60	90	120	60	90	120	90	120	180	250
Concentración mg/mL	30	60	90	120	60	90	120	90	120	180	250
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus β-hemolítico</i>	+	+	+	/	-	-	-	+	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	/	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	/	+	+	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	/	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	/	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebiselia pnumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/
(-) no presentó, (+) presentó y (/) no se probó											

Antibiogramas del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*:

Inflorescencias y hojas-tallos. Evaluando su efecto antimicrobiano a las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mg/mL con un testigo impregnado con alcohol, se retaron 11 bacterias y 5 hongos todos ellos patógenos para el ser humano.

El extracto hojas-tallos no mostró efecto antimicrobiano, ya que los microorganismos probados crecieron en presencia de este. En consecuencia los microorganismos presentaron resistentes a este.

El extracto de inflorescencias; si presentó efecto antimicrobiano; ya que se observaron halos de inhibición en los antibiogramas realizados, presentando sensibilidad 6 de las 11 bacterias que se probaron, también los antibiogramas para hongos, estos no fueron sensibles a el extracto, las estructuras antes mencionadas estaban reportadas con efecto terapéutico para aliviar enfermedades de vías respiratorias como refieren Waizel y colaboradores en 2009. Aunque se debe esperar la época de floración para colectarlas.

Con las inflorescencias se decidió primero se determinaron las concentraciones de 30, 60 y 90 mg/mL, siendo sensibles *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β-hemolitico*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, después se determinaron las concentraciones de 60, 90 y 120 mg/mL inhibiendo el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium xerosis*.

Con base a lo anterior, se estableció la concentración de 30 mg/mL como la mínima inhibitoria, ya que fue la más baja a la que se apreció el efecto antimicrobiano; asimismo Davicino y colaboradores en 2007, encontraron efecto antimicrobiano para *Gnaphalium sp.* a la concentración mínima inhibitoria de 250 mg/mL. Es favorable el resultado de 30 mg/mL porque con menor cantidad del principio activo se da el efecto antimicrobiano.

Ramírez y colaboradores en 2014, reportaron efecto antimicrobiano del extracto *Gnaphalium* especie para bacterias Gram positivas y negativas, sin embargo, en este trabajo se encontró efecto antimicrobiano del extracto de inflorescencias para las bacterias Gram positivas, es bueno este resultado porque actúa el extracto específicamente en estas bacterias (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β-hemolitico*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium xerosis*).

El método de difusión en disco realizado para el extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, para este fueron sensibles seis bacterias, en todas al incrementar las concentraciones también incremento el halo de inhibición en *Enterococcus faecalis* (figura 12), *Streptococcus β-hemolitico* (figura 13), *Streptococcus mutans* (figura 14), *Staphylococcus aureus* (figura 15), *Streptococcus pyogenes* (figura 16) y *Corynebacterium xerosis* (figura 17).

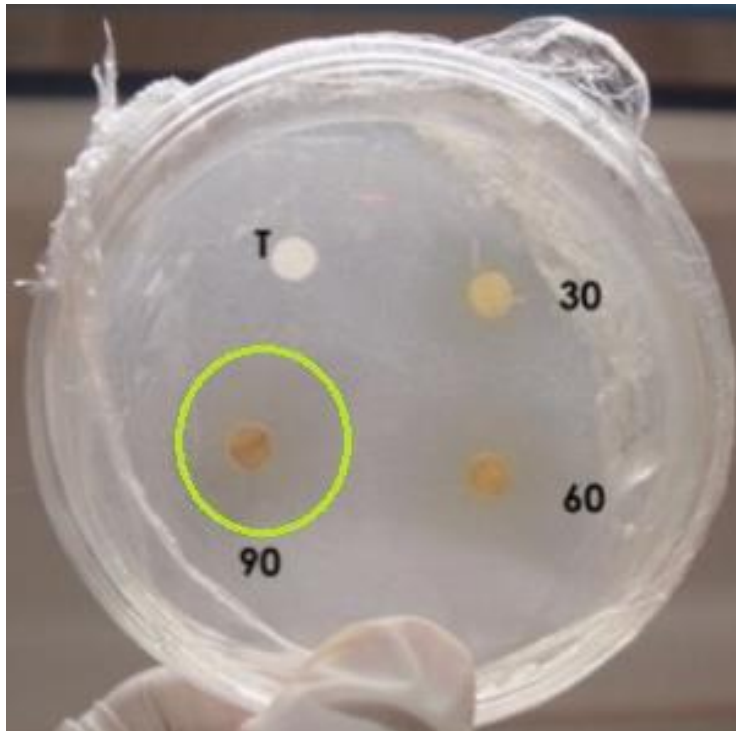


Figura 12. Difusión en disco del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, para *Enterococcus faecalis*.

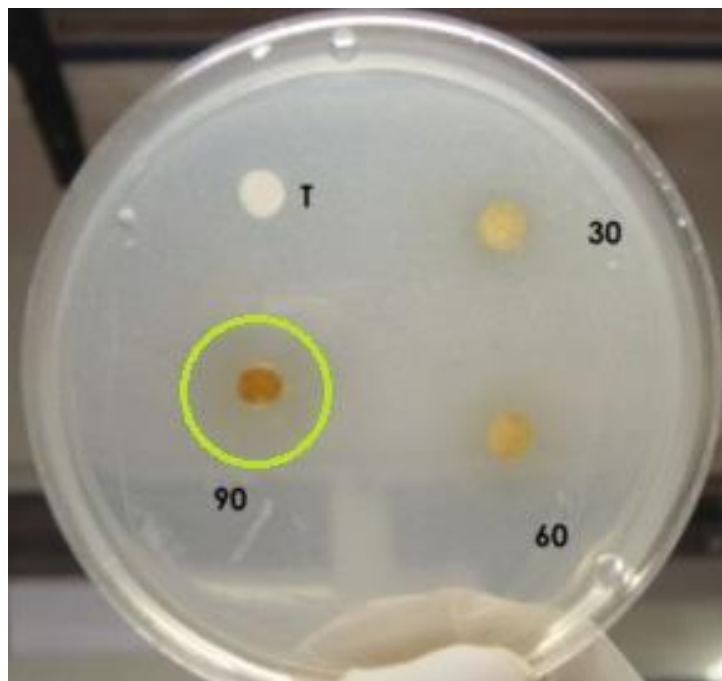


Figura 13. Difusión en disco del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, para *Streptococcus beta-hemolyticus*

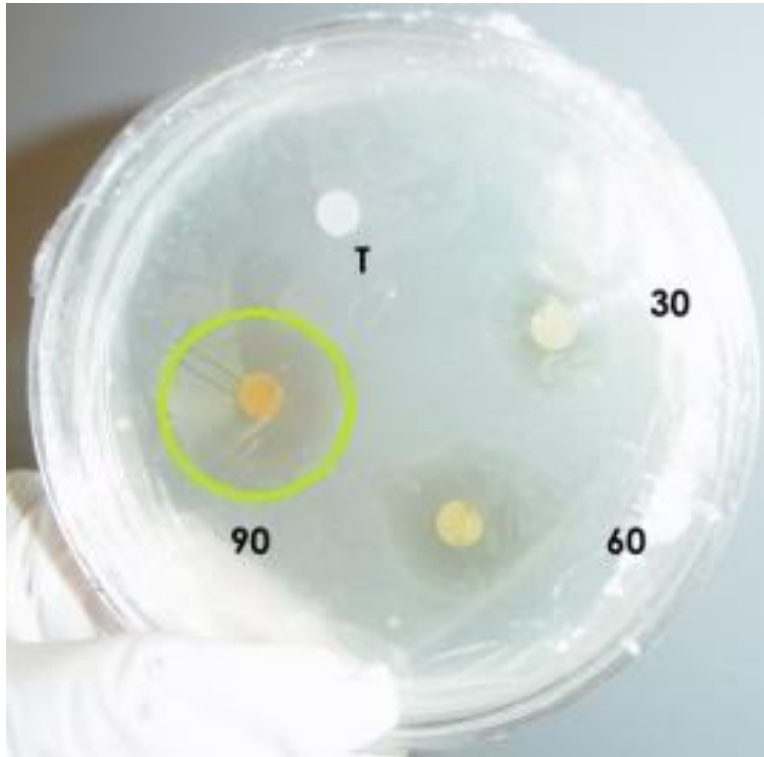


Figura 14. Difusión en disco del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, para *Streptococcus mutans*.

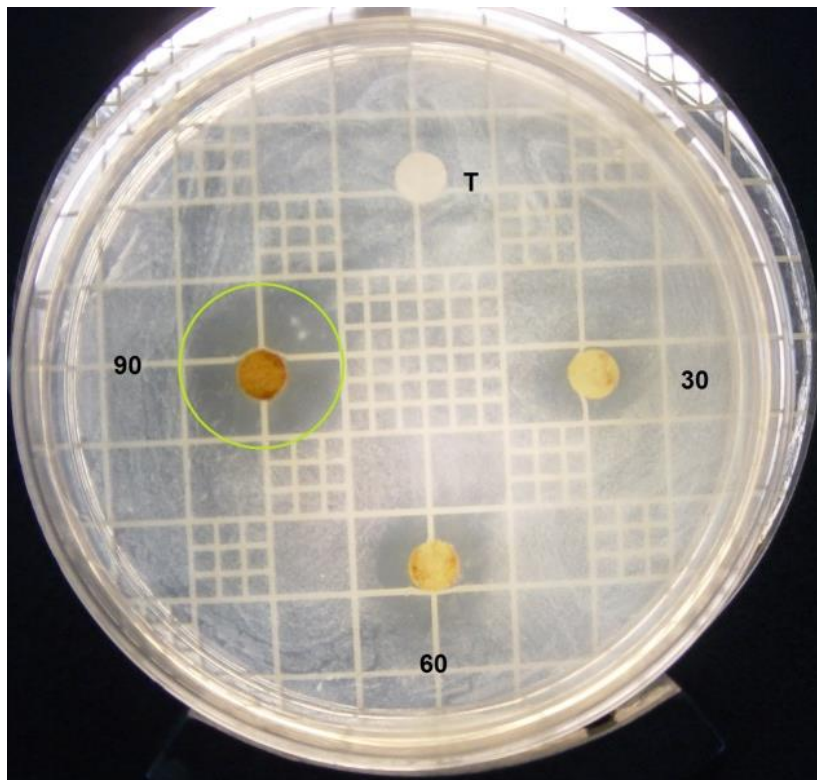


Figura 15. Difusión en disco del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, para *Staphylococcus aureus*.

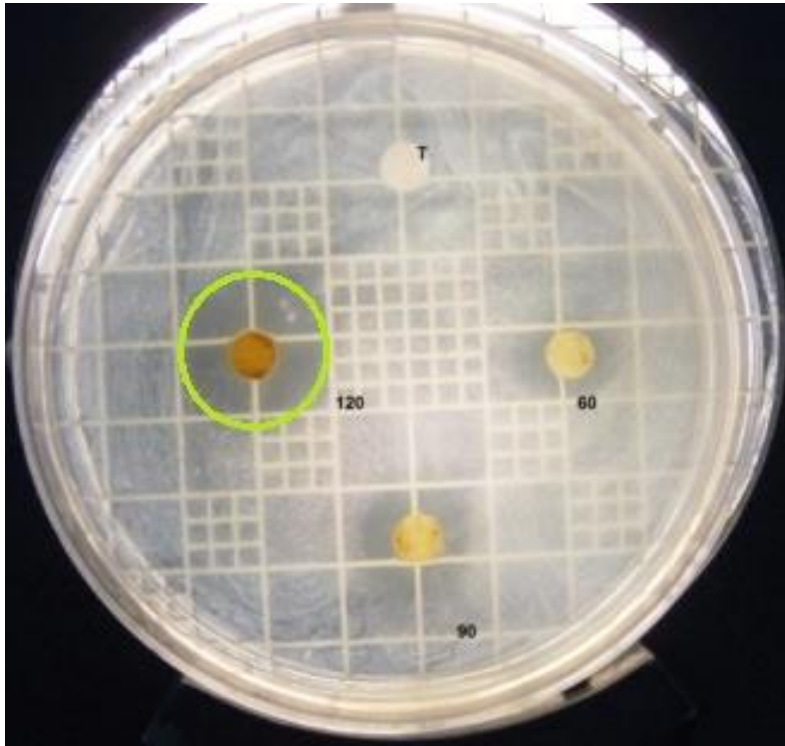


Figura 16. Difusión en disco del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, para *Streptococcus pyogenes*.

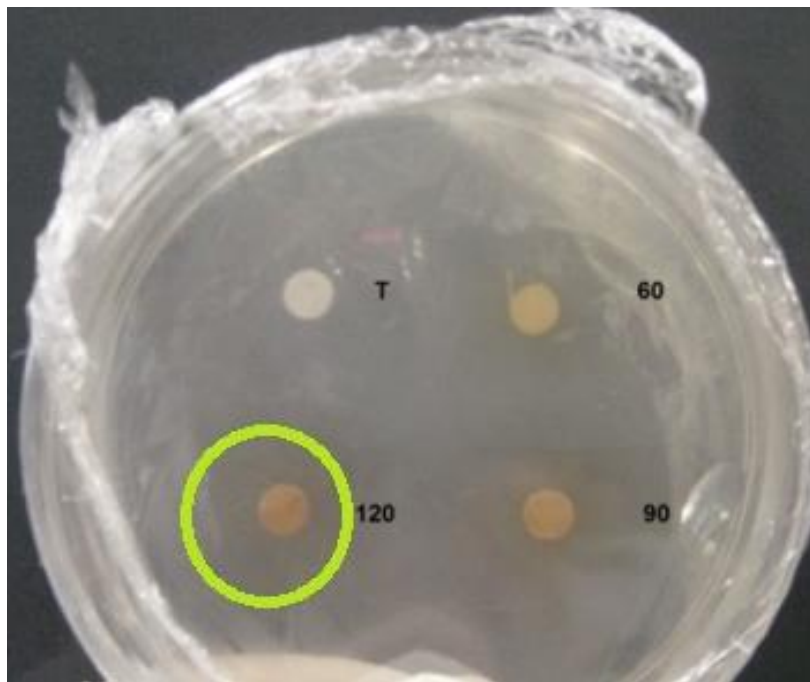


Figura 17. Difusión en disco del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, para *Corynebacterium xerosis*.

Análisis estadístico de las concentraciones del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*.

El análisis estadístico se realizó con el software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XV, con un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, si se presentó diferencia significativa entre las concentraciones. Los resultados fueron los siguientes:

Las concentraciones valoradas del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, hubo diferencia estadística significativa entre ellas ya que el valor de p es menor de 0.05 (cuadro 4), en *Enterococcus faecalis* (gráfica 1, cuadro 5,6), *Streptococcus β-hemolitico* (gráfica 2, cuadro 7,8), *Staphylococcus aureus* (gráfica 4, cuadro 11,12), *Streptococcus pyogenes* (gráfica 5, cuadro 13,14) y *Corynebacterium xerosis* (gráfica 6, cuadro 15,16), hubo diferencia significativa entre las concentraciones de 30 y 90 mg/mL en *Streptococcus mutans* (gráfica 3, cuadro 9,10).

Cuadro 4. Diferencias y/o semejanzas de las concentraciones del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*.

inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i> concentraciones mg/mL					
Bacteria	30 y 60	30 y 90	60 y 90	60 y 120	90 y 120
<i>Enterococcus faecalis</i>	*	*	*		
<i>Streptococcus β-hemolitico</i>	*	*	*		
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	*	*		
<i>Streptococcus mutans</i>		*			
<i>Streptococcus pyogenes</i>				*	*
<i>Corynebacterium xerosis</i>				*	*
*=diferentes					

Cuadro 5. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, contra *Enterococcus faecalis*.

ANOVA Table for EF by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

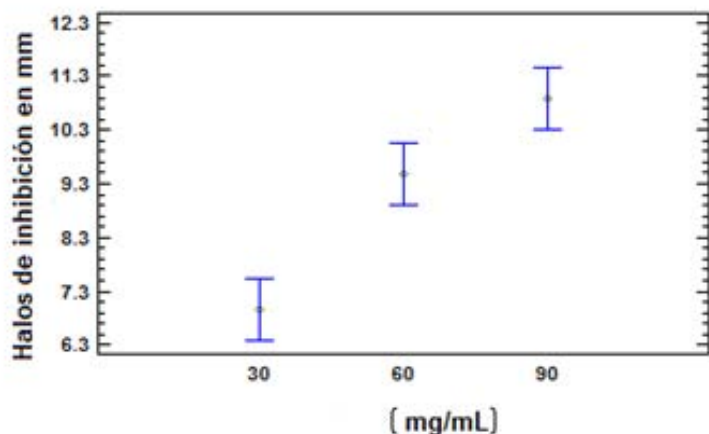
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	39.4391	2	19.7195	42.49	0.0000
Within groups	5.56912	12	0.464093		
Total (Corr.)	45.0082	14			

Cuadro 6. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, contra *Enterococcus faecalis*.

Multiple Range Tests for EF by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Trat1 <i>Gnaphalium viscosum</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
30	5	6.96	x
60	5	9.474	x
90	5	10.88	x



Gráfica 1. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, frente a *Enterococcus faecalis*.

Cuadro 7. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Streptococcus β-hemolitico*.

ANOVA Table for SBH by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

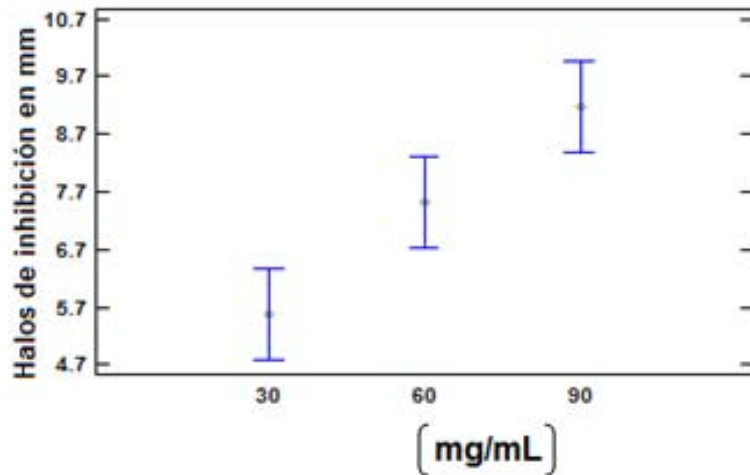
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	32.4653	2	16.2327	18.16	0.0002
Within groups	10.724	12	0.893667		
Total (Corr.)	43.1893	14			

Cuadro 8. Prueba de Tukey las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Streptococcus β-hemolitico*.

Multiple Range Tests for SBH by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Trat1 <i>Gnaphalium viscosum</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
30	5	5.58	x
60	5	7.52	x
90	5	9.18	x



Gráfica 2. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, frente a *Streptococcus beta-hemolitico*.

Cuadro 9. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Streptococcus mutans*.

ANOVA Table for SM by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

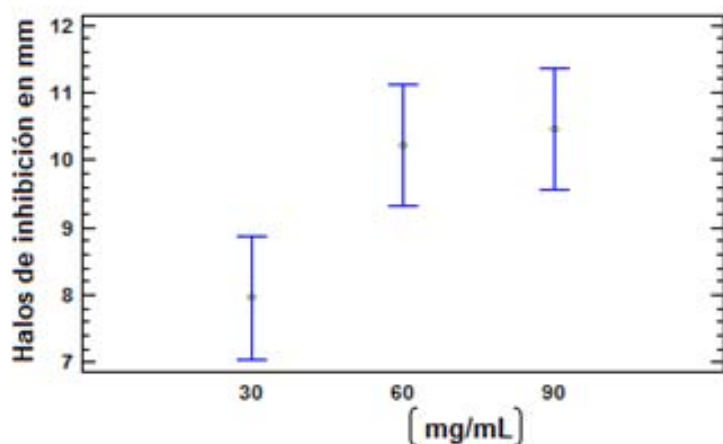
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	19.0253	2	9.51267	8.14	0.0058
Within groups	14.032	12	1.16933		
Total (Corr.)	33.0573	14			

Cuadro 10. Prueba de Tukey de las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Streptococcus mutans*.

Multiple Range Tests for SM by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Trat1 <i>Gnaphalium viscosum</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
30	5	7.96	x
60	5	10.22	x
90	5	10.46	x



Gráfica 3. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, frente a *Streptococcus mutans*.

Cuadro 11. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Staphylococcus aureus*.

ANOVA Table for SA by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

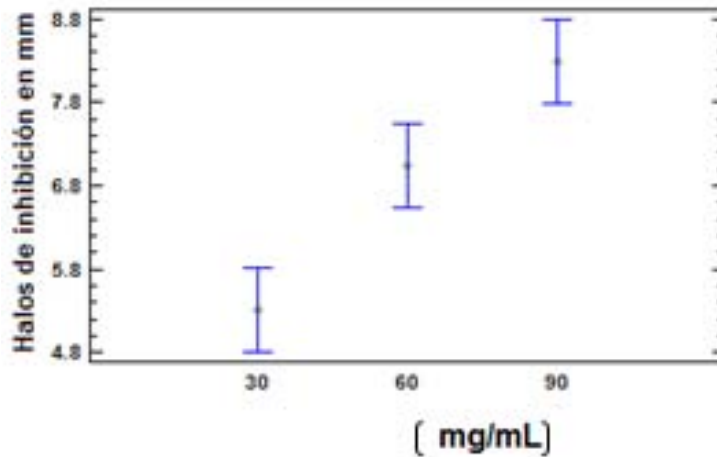
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	22.096	2	11.048	31.51	0.0000
Within groups	4.208	12	0.350667		
Total (Corr.)	26.304	14			

Cuadro 12. Prueba de Tukey para de las concentraciones del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Staphylococcus aureus*.

Multiple Range Tests for SA by Trat1 *Gnaphalium viscosum*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Trat1 <i>Gnaphalium viscosum</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
30	5	5.32	x
60	5	7.04	x
90	5	8.28	x



Gráfica 4. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, frente a *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 13. Análisis de varianza las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Streptococcus pyogenes*.

ANOVA Table for SP by Tra 2 *Gnaphalium viscosum*

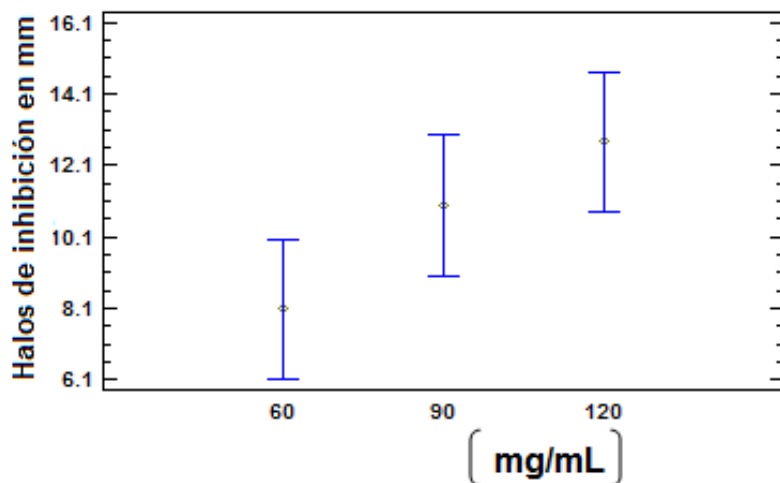
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	55.8013	2	27.9007	5.19	0.0237
Within groups	64.488	12	5.374		
Total (Corr.)	120.289	14			

Cuadro 14. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Streptococcus pyogenes*.

Multiple Range Tests for gvSP by Tra 1 *Gnaphalium viscosum*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tra 2 <i>Gnaphalium viscosum</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	8.08	X
90	5	10.98	XX
120	5	12.76	X



Gráfica 5. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, frente *Streptococcus pyogenes*.

Cuadro15. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Corynebacterium xerosis*.

ANOVA Table for CX by Tra 2 *Gnaphalium viscosum*

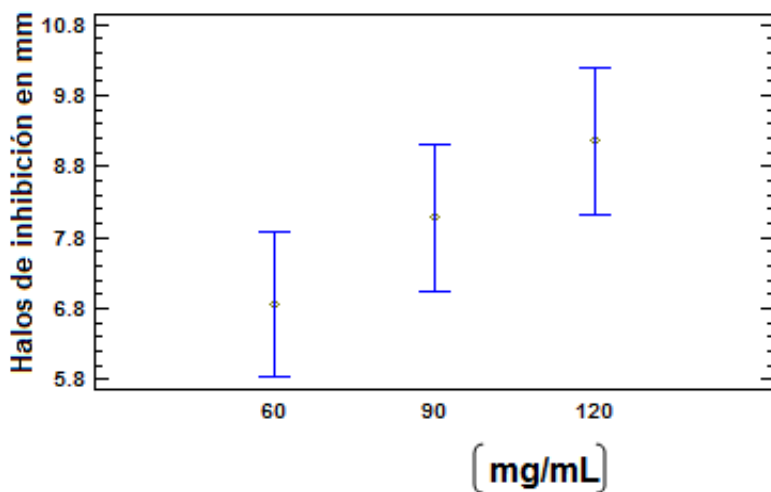
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	13.2413	2	6.62067	4.45	0.0359
Within groups	17.872	12	1.48933		
Total (Corr.)	31.1133	14			

Cuadro16. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, contra *Corynebacterium xerosis*.

Multiple Range Tests for CX by Tra 2 *Gnaphalium viscosum*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tra 2 <i>Gnaphalium viscosum</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	6.86	X
90	5	8.08	XX
120	5	9.16	X



Gráfica 6. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, *Corynebacterium xerosis*.

Antibiogramas del extracto de estróbilos de *Pinus patula* Schl.et Cham.

En esta planta se estudiaron tres estructuras: estróbilos, ramas y acículas; se prepararon dos extractos: estróbilos y ramas-acículas. Se evaluó el efecto antimicrobiano a las concentraciones de 60, 90 y 120 mg/mL; con un testigo impregnado de alcohol; frente a 11 bacterias y 5 hongos, los cuales son considerados como patógenos del ser humano.

El extracto de ramas-acículas de *Pinus patula*, no tuvo efecto antimicrobiano ya que los microorganismos fueron resistentes a este. En contraparte, Amaya y colaboradores en 2008, en el extracto de acículas de *Pinus* especie, encontraron efecto antimicrobiano para *Streptococcus enteritidis* y *Escherichia coli*.

Özkalp y colaboradores en 2009, encontraron efecto antimicrobiano de *Pinus* especie para la bacteria *Staphylococcus aureus*, el extracto de estróbilos de *Pinus patula* mostró efecto antimicrobiano para esta bacteria y además para *Enterococcus faecalis*.

El extracto de estróbilos *Pinus patula* manifestó efecto antimicrobiano a la concentración de 60 mg/mL, tal como lo mencionan Özkalp y colaboradores en 2009, sin embargo Oluwadayo y colaboradores en 2008 encontraron efecto antimicrobiano de *Pinus* especie a la concentración de 1000 mg/mL, es favorable el resultado de la concentración de 60 mg/mL ya que se requieren cantidades menores del extracto para que se dé el efecto antimicrobiano.

En el método por difusión en disco valorando el extracto de estróbilos *Pinus patula* fueron sensibles *Enterococcus faecalis* (figura 18) y *Staphylococcus aureus* (figura 19), notándose que al aumentar las concentraciones también la zona de inhibición.

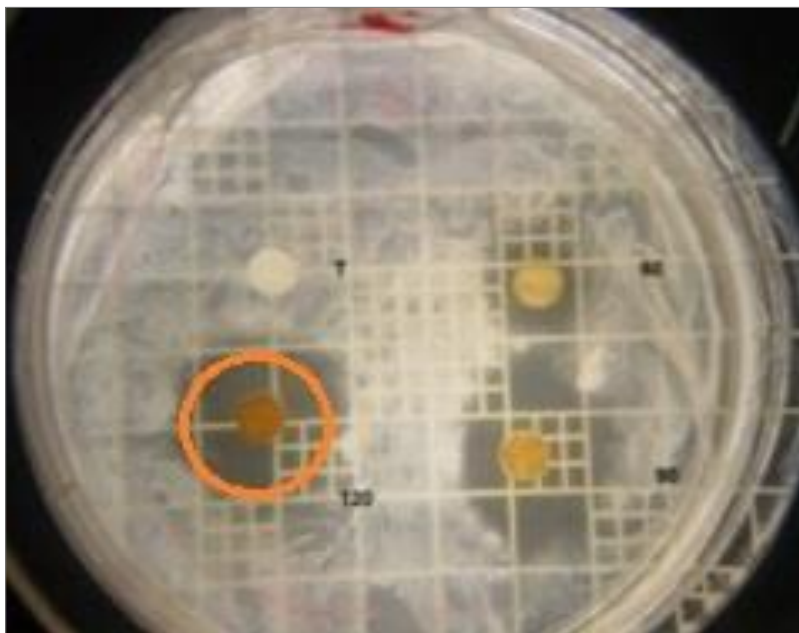


Figura 18. Difusión en disco del extracto estróbilos *Pinus patula*, para *Enterococcus faecalis*.

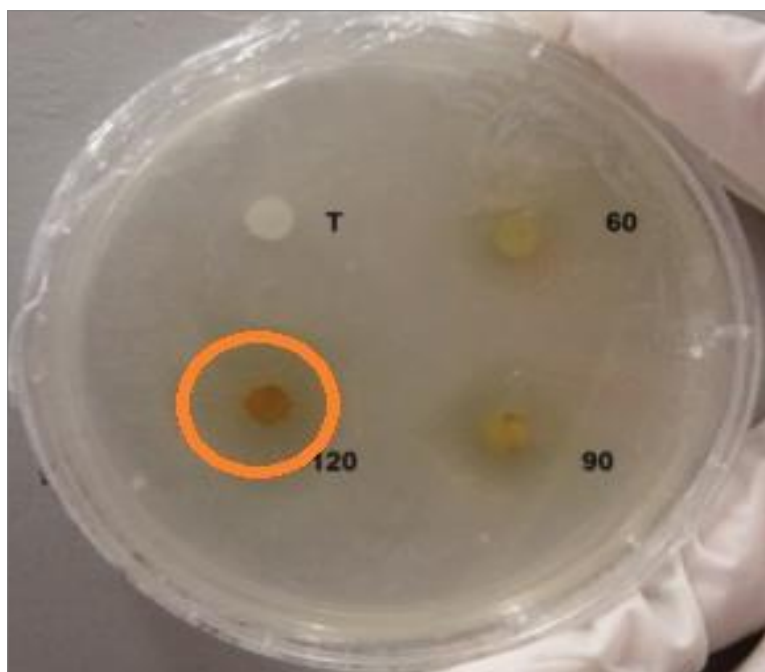


Figura 19. Difusión en disco del extracto estróbilos *Pinus patula*, para *Staphylococcus aureus*.

Análisis estadístico de las concentraciones del extracto de estróbilos *Pinus patula*.

Se realizó una prueba de varianza y una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, con el software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XV, mostrando lo siguiente:

Para las concentraciones establecidas del extracto estróbilos *Pinus patula*, no hubo diferencia significativa ya el valor de p es mayor a 0.05 (cuadro 17), en *Enterococcus faecalis* (gráfica 7, cuadro 18,19) y *Staphylococcus aureus* (gráfica 8 y cuadro 20,21).

Cuadro 17. Diferencias o semejanzas entre las concentraciones del extracto estróbilos *Pinus patula*.

Estróbilos <i>Pinus patula</i>			
	Concentraciones mg/mL		
Bacteria	60 y 90	60 y 120	90 y 120
<i>Enterococcus faecalis</i>			
<i>Staphylococcus aureus</i>			
*=diferentes			

Cuadro 18. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto estróbilos *Pinus patula*, contra *Enterococcus faecalis*.

ANOVA Table for EF by Tra3 *Pinus patula*

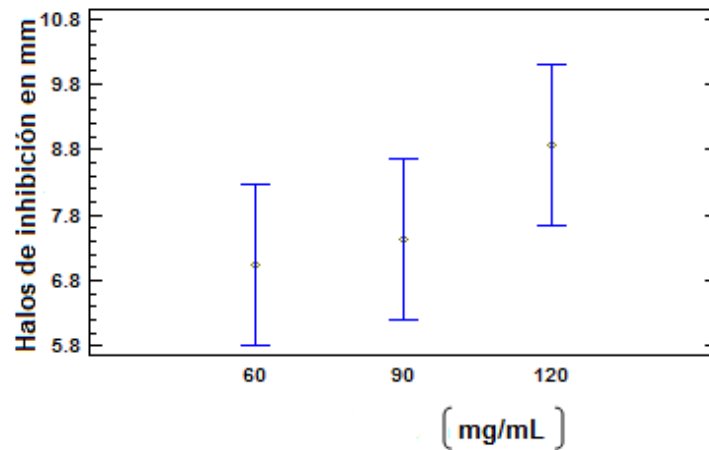
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9.21733	2	4.60867	2.16	0.1577
Within groups	25.572	12	2.131		
Total (Corr.)	34.7893	14			

Cuadro 19. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto estróbilos *Pinus patula*, contra *Enterococcus faecalis*.

Multiple Range Tests for EF by Tra3 *Pinus patula*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tra3 <i>Pinuspatula</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	7.04	X
90	5	7.42	X
120	5	8.86	X



Gráfica 7. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto de estróbilos *Pinus patula*, frente *Enterococcus faecalis*.

Cuadro 20. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto estróbilos *Pinus patula*, contra *Staphylococcus aureus*.

ANOVA Table for SA by Tra3 *Pinus patula*

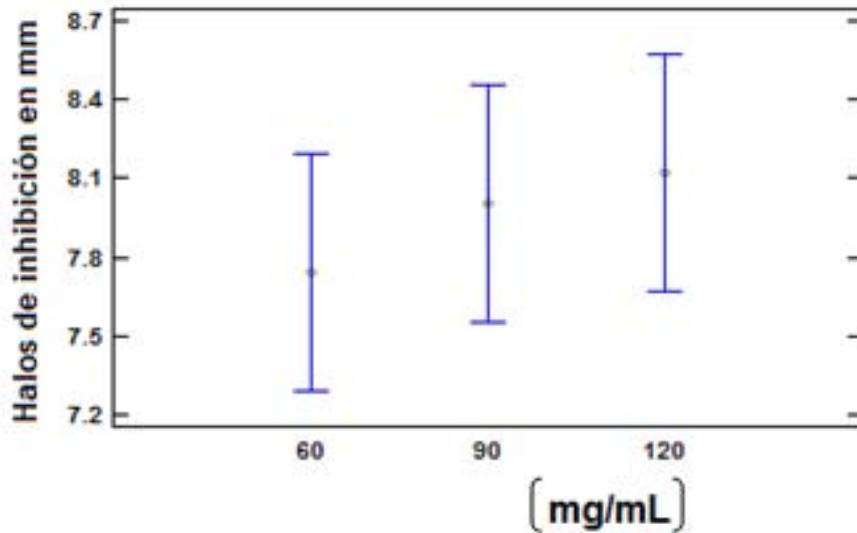
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.377333	2	0.188667	0.67	0.5318
Within groups	3.4	12	0.283333		
Total (Corr.)	3.77733	14			

Cuadro 21. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto estróbilos *Pinus patula*, contra *Staphylococcus aureus*.

Multiple Range Tests for SA by Tra3 *Pinus patula*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tra3 <i>Pinus patula</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	7.74	X
90	5	8.0	X
120	5	8.12	X



Gráfica 8. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto estróbilos *Pinus patula*, frente *Staphylococcus aureus*.

Antibiogramas del extracto de espigas *Plantago major* L.

Las hojas y espigas están reportadas con efecto terapéutico como menciona Vázquez en 2009. por lo que estableció evaluar el efecto antimicrobiano a los extractos de hojas y espigas a las concentraciones de 90, 120, 180 y 250 mg/mL y un testigo con alcohol. Frente a 11 bacterias y 5 hongos considerados como patógenos del ser humano.

No presentó efecto antimicrobiano el extracto de hojas ya que fueron resistentes las bacterias y hongos probados. Por el contrario, Vázquez en 2009 especificó el efecto antimicrobiano del extracto de hojas *Plantago major* a una concentración del 50% con etanol sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacilos subtilis*, *Streptococcus dysenteriae* y *Escherichia coli*, con un diámetro del halo de inhibición de 10-15 milímetros.

Las concentraciones de 90, 120, 180 y 250 mg/mL del extracto de espigas *Plantago major* mostró efecto antimicrobiano para tres bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β-hemolítico* y *Escherichia coli*, tal como lo mencionan Sharifa y colaboradores en 2008, que el efecto del extracto de *Plantago major*, fue sensible tanto bacterias Gram positivas y negativas. Este extracto presentó efecto antimicrobiano para ambas bacterias Gram positivas y negativas, en consecuencia puede combatir diferentes enfermedades causadas por estas.

El extracto de espigas *Plantago major* presentó efecto antimicrobiano a la concentración de 90 mg/mL, siendo esta concentración menor a la que encontraron Sharifa y colaboradores en 2008 en la que el efecto del extracto de *Plantago major* se presentó a 100 mg/mL, este resultado es favorable ya que se necesitan cantidades más pequeñas de material vegetal para que ocurra el efecto.

Destaca lo consecuente del extracto espigas *Plantago major*, que presentó efecto antimicrobiano a la concentración mínima inhibitoria de 90 mg/mL, del cual no se habían reportado como sensibles *Enterococcus faecalis* causante de enfermedad en vías urinarias y *Streptococcus β -hemolítico* culpable de neumonia bacteriana. En consecuencia de esto; es benéfico saber que el extracto de espigas *Plantago major*, presenta efecto terapéutico contra estas bacterias.

En el método por difusión en disco del extracto espigas *Plantago major* fueron sensibles: *Enterococcus faecalis* (figura 20), *Streptococcus β -hemolítico* (figura 21) y *Escherichia coli* (figura 22), remarcando que al incrementar las concentraciones, los halos de inhibición fueron del mismo tamaño, debido a polaridad intermedia de los compuestos orgánicos de acuerdo a Vázquez en 2009, que conforman los grupos funcionales del extracto.

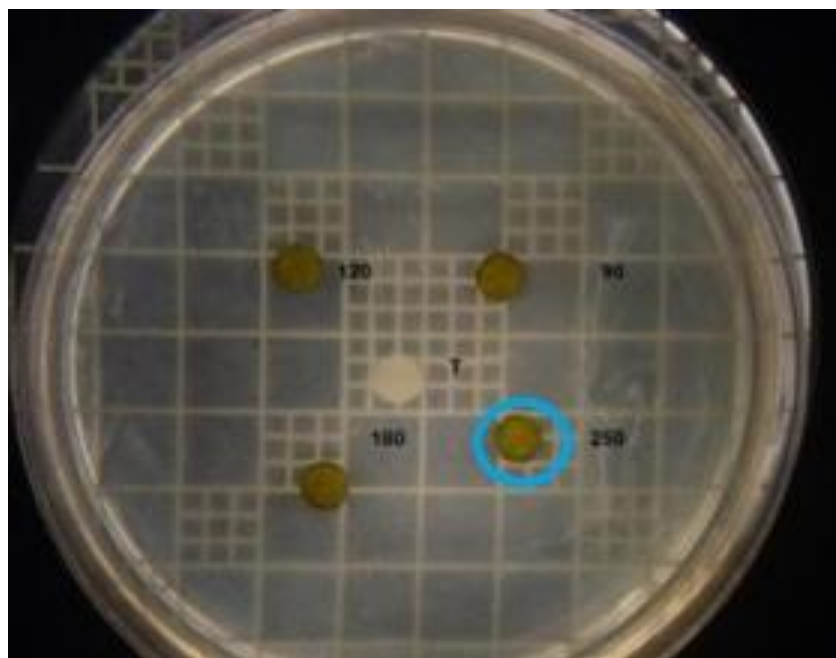


Figura 20. Difusión en disco del extracto espigas *Plantago major*, para *Enterococcus faecalis*.

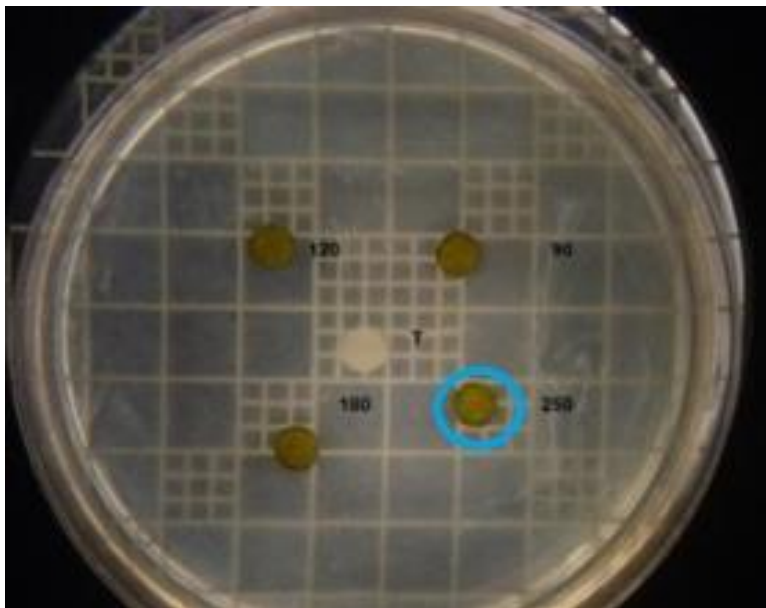


Figura 21. Difusión en disco del extracto espigas *Plantago major*, para *Streptococcus beta-hemolyticus*.

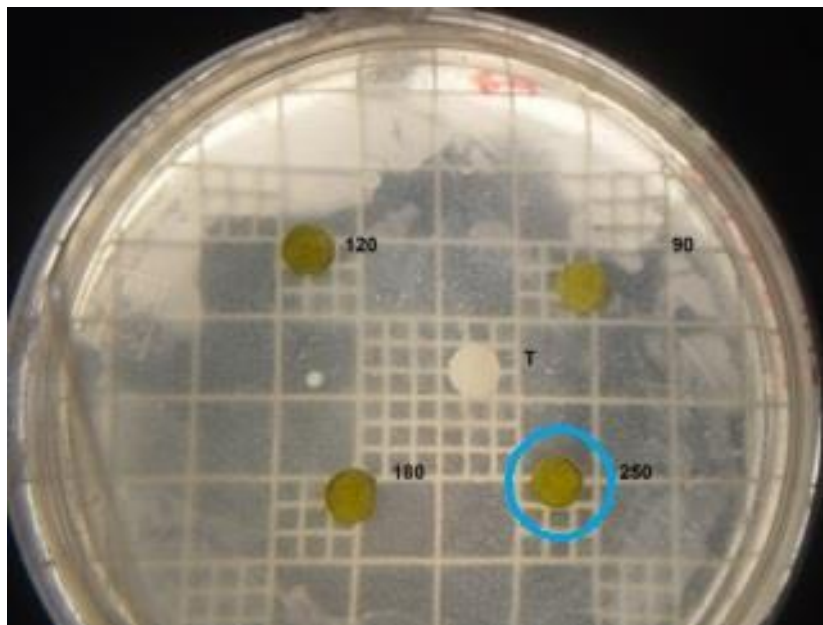


Figura 22. Difusión en disco del extracto espigas *Plantago major*, para *Escherichia coli*.

Análisis estadístico de las concentraciones del extracto de espigas *Plantago major L.*

Se realizó una prueba de varianza y una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, para las concentraciones del extracto espigas

Plantago major hubo diferencia significativa para ya que el valor p es menor a 0.05 (cuadro 22) en *Enterococcus faecalis* (grafica 9, cuadro 23,24), no hubo diferencia significativa porque el valor de p es mayor a 0.05 (cuadro 22) en *Streptococcus β-hemolítico* (grafica 10, cuadro 25,26) y *Escherichia coli* (grafica 11, cuadro 27,28).

Cuadro 22. Diferencias o semejanzas entre las concentraciones del extracto espigas *Plantago major*

espigas <i>Plantago major</i>		concentraciones mg/mL				
Bacteria	90 y 120	90 y 180	90 y 250	120 y 180	120 y 250	180 y 250
<i>Enterococcus faecalis</i>	*	*	*			
<i>Streptococcus β-hemolítico</i>						
<i>Escherichia coli</i>						
*=diferentes						

Cuadro 23. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto espigas *Plantago major*, contra *Enterococcus faecalis*.

ANOVA Table for EF by Tra4 *Plantago major*

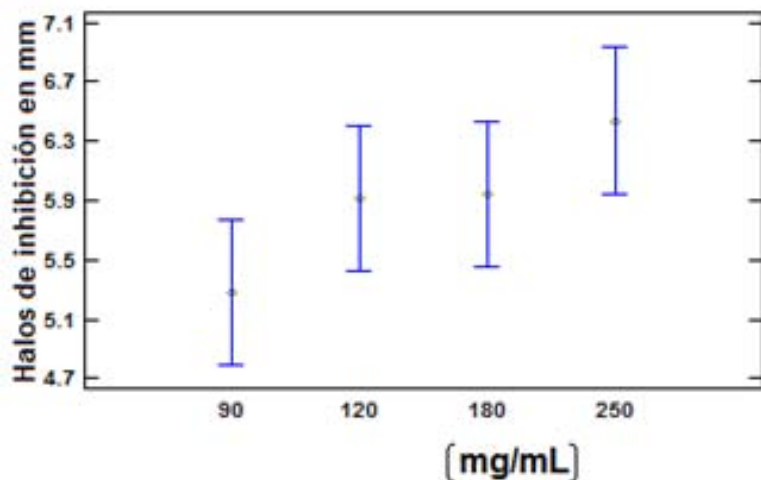
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.3895	3	1.12983	3.85	0.0301
Within groups	4.7	16	0.29375		
Total (Corr.)	8.0895	19			

Cuadro 24. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto espigas *Plantago major*, contra *Enterococcus faecalis*.

Multiple Range Tests for EF by Tra4 *Plantago major*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tra4 <i>Plantago major</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	5.28	X
120	5	5.92	XX
180	5	5.94	XX
250	5	6.44	X



Gráfica 9. Concentraciones evaluadas del extracto espigas *Plantago major*, frente *Enterococcus faecalis*.

Cuadro 25. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto espigas *Plantago major*, contra *Streptococcus β-hemolítico*.

ANOVA Table for SBH by Tra4 *Plantago major*

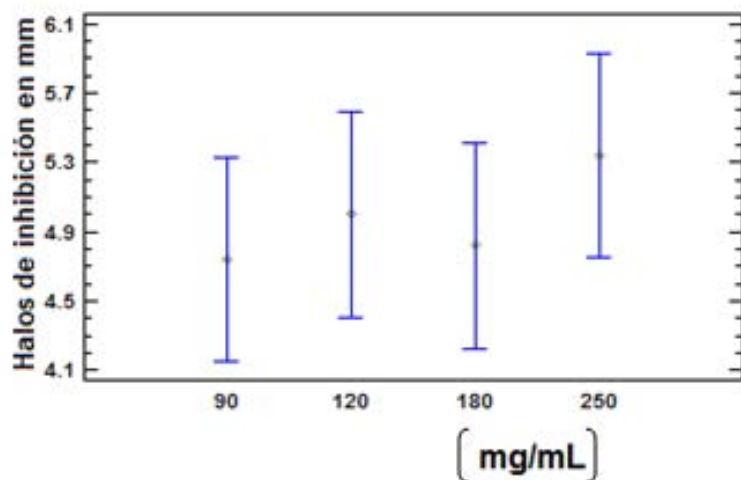
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.0655	3	0.355167	0.83	0.4982
Within groups	6.872	16	0.4295		
Total (Corr.)	7.9375	19			

Cuadro 26. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto espigas *Plantago major*, contra *Streptococcus β-hemolítico*.

Multiple Range Tests for SBH by Tra4 *Plantago major*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tra4 <i>Plantago major</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	4.74	X
180	5	4.82	X
120	5	5.0	X
250	5	5.34	X



Gráfica 10. Concentraciones evaluadas del extracto espigas de *Plantago major*, frente *Streptococcus beta-hemolitico*.

Cuadro 27. Análisis de varianza para las concentraciones del extracto espigas *Plantago major*, contra *Escherichia coli*.

ANOVA Table for EC by Tra4 *Plantago major*

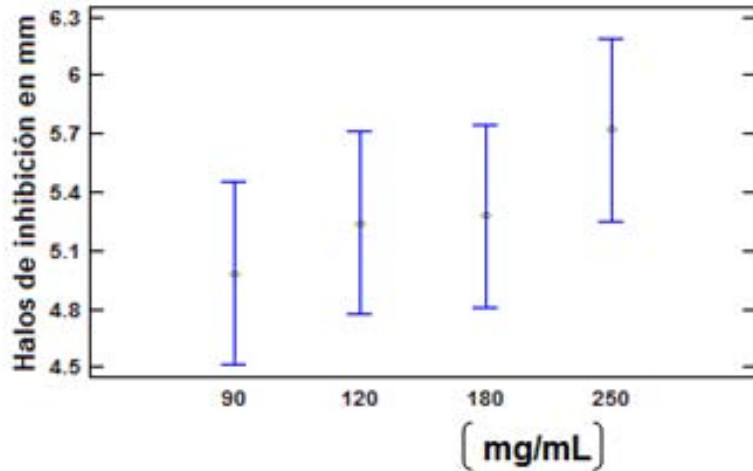
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.4135	3	0.471167	1.75	0.1963
Within groups	4.296	16	0.2685		
Total (Corr.)	5.7095	19			

Cuadro 28. Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto espigas *Plantago major*, contra *Escherichia coli*.

Multiple Range Tests for EC by Tra4 *Plantago major*

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tra4 <i>Plantago major</i>	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	4.98	X
120	5	5.24	X
180	5	5.28	X
250	5	5.72	X



Gráfica 11. Tamaño de los halos de inhibición por concentración del extracto espigas *Plantago major*, frente *Escherichia coli*.

Resultados de la prueba de toxicidad para el extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*.

En la figura 24 se observa la eclosión de los nauplios de *Artemia salina* Lech y en la figura 25 se aprecia como monto el experimento con un testigo con artemias y solución salina, con cinco repeticiones cada uno se le agrego 30 mg/mL del extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum*, 50 nauplios de *Artemia* y 50 mL de solución salina; después de 24 horas se realizó el conteo y calculo el porcentaje de mortandad que fue de 21.6; de acuerdo Gamiño en 2009 no es tóxico porque no revazo la dosis letal media (cuadro 29).



Figura 23. Eclosión de los nauplios vistos a través del estereoscopio.



Figura 24. Pruebas de toxicidad de inflorescencias *Gnaphalium viscosum* evaluando la concentración de 30 mg/mL.

Cuadro 29. Toxicidad de la concentración 30 mg/mL del extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum* frente *Artemia salina* Lech.

Nombre del extracto	Inflorescencias <i>Gnaphalium viscosum</i>
mg/mL	30
Porcentaje de mortandad	21.6
DL ₅₀	No tóxico

Interpretación del IR realizado al extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum* H.B.K.

Los extractos etanólicos de las plantas de estudio están conformados por compuestos orgánicos, los cuales en una estructura más simple tienen grupos funcionales que posiblemente son los responsables del efecto antimicrobiano. Estos grupos se identificaron por espectroscopia de IR; se tomó una muestra de los extractos secos y se realizaron los espectros correspondientes en pastilla de KBr en un espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer. Para la asignación de señales a los grupos funcionales presentes se tomaron como base las tablas de correlación para la interpretación de los espectros IR.

En la figura 25 es indicativo del espectro de inflorescencias *Gnaphalium viscosum*:

En la longitud de onda se ubica el grupo alcano (CH₂ y CH₃ a 2962-2853 cm⁻¹), se asignó en 2928.2 cm⁻¹, 2870 cm⁻¹, con correlación en 1454 cm⁻¹ y 1380 cm⁻¹; y los hidrocarburos compuestos de Carbono e Hidrógeno formando enlaces simple, son compuestos saturados.

A estos se les conocen también como parafinas, es decir, los alcanos son compuestos poco reactivos (Brown, 2007).

El grupo alcohol (O-H a 3550 a 3450 cm^{-1} y primario a 1050, 1350-1260 cm^{-1}), se fijó en 3300 cm^{-1} con reciprocidad en 1150 cm^{-1} , estos compuestos químicos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo (-OH) en sustitución de un átomo de hidrógeno, enlazado de forma covalente a un átomo de carbono. Además este carbono debe estar saturado, es decir, debe tener solo enlaces simples, son ácidos, el hidrógeno del grupo -OH. Pueden comportarse como ácidos o bases, por lo que se establece un dipolo muy parecido al que presenta la molécula de agua (Gutiérrez y col, 2010).

La amida primaria aproximadamente en 3500 y en 1629-1590 cm^{-1} se situó en 3439.4 cm^{-1} . Una amida en un derivado de un ácido carboxílico por sustitución de grupo oxidrilo (-OH) del ácido por un grupo -NH₂, -NHR o -NR, R₂ llamado grupo amino. Se caracterizan por tener un átomo de nitrógeno unido al grupo carbonilo. Existen tres tipos: primarias, secundarias y terciarias, dependiendo del grado de sustitución del átomo de nitrógeno (Brown, 2007).

2928.2 cm^{-1}	3300 cm^{-1}	3439.4 cm^{-1}
Alcano	Alcohol primario	Amida primaria

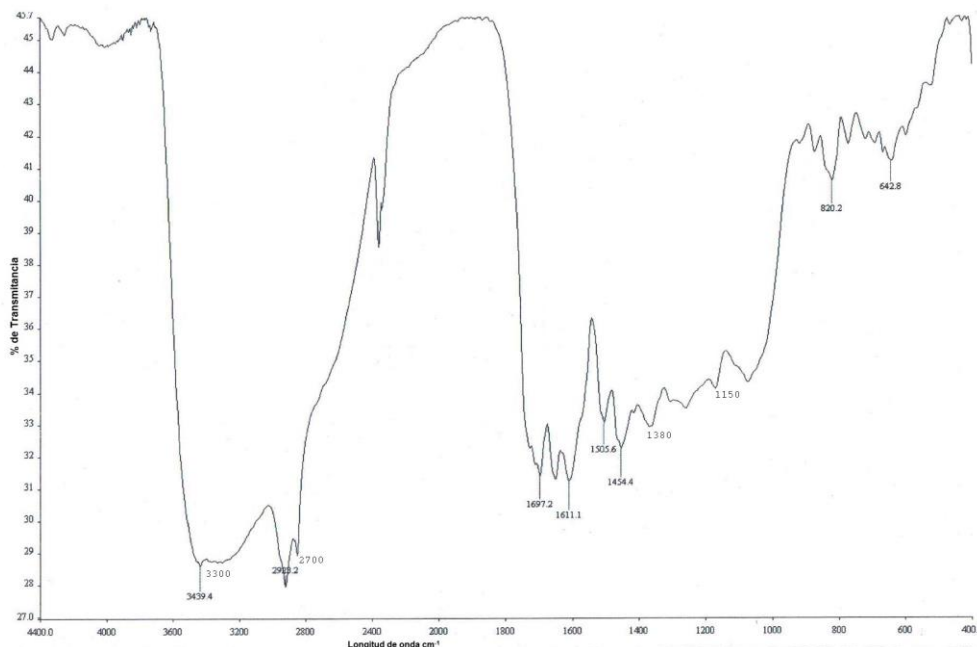


Figura 25. Espectro de infrarrojo del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*.

Se infiere que los grupos funcionales (amida primaria, alcanos y alcohol primario) del extracto inflorescencias *Gnaphalium viscosum*, identificados a partir de un examen IR y junto con las tablas de correlación (figura 25), estos integran a los compuestos orgánicos de los taninos y flavonoides (Waizel y colaboradores en 2009), los cuales inhibieron el crecimiento de las bacterias sensibles. Se corrobora el uso que se le a dado a estas estructuras y los grupos funcionales que posiblemente dan el efecto antimicrobiano.

Interpretación del IR realizado al extracto de estróbilos *Pinus patula* Schl.et Cham

La figura 26 corresponde al espectro IR del extracto de estróbilos *Pinus patula*

El grupo alcano en la longitud de onda se asignó a 2850 cm^{-1} , son los hidrocarburos compuestos de Carbono e Hidrógeno formando enlaces simples, son compuestos saturados. A estos son compuestos poco reactivos, (Brown, 2007).

El fenol se designó en 1600 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , los fenoles: son compuestos que presentan uno o más grupos hidroxilo (OH) unidos directamente a un anillo aromático. El fenol es el compuesto más sencillo de esta serie homóloga y es denominado también hidroxibenceno. Pueden en general, reaccionar de dos maneras diferentes, en una, los cambios químicos se producen en el grupo hidroxilo y en la otra en el propio anillo bencénico. Participan en procesos de óxido-reducción (Gutiérrez y col, 2010).

El alcohol a 3300 cm^{-1} , y un primario en 1050 cm^{-1} , se señaló a 3300 cm^{-1} , con huella digital en 1068.6 cm^{-1} , Los alcoholes son compuestos químicos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo (-OH) forman enlace covalente a un átomo de carbono. Además este debe estar saturado, es decir, por lo que se establece un dipolo muy parecido al que presenta la molécula de agua (Gutiérrez y col, 2010).

La amida se ubicó aproximadamente en 3500 cm^{-1} , y la amida primaria en $1700\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$, en la región 3442.5 cm^{-1} ; 1600 cm^{-1} , y 1500 cm^{-1} , una amida es un derivado de un ácido carboxílico por sustitución de grupo hidroxilo (-OH) del ácido por un grupo $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$ o $-\text{NR}$, R_2 llamado grupo amino. Se caracteriza por tener un átomo de nitrógeno unido al grupo

carbonilo. Existen tres tipos: primarias, secundarias y terciarias, dependiendo del grado de sustitución del átomo de nitrógeno (Brown, 2007).

En el espectro se observa la señal a 3442.5 cm^{-1} de la amina secundaria en $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$, de mayor intensidad que la señal a 3300 cm^{-1} , (OH), corrobora en 1506 cm^{-1} , este extracto está formado por un grupo funcional amina, se consideran compuestos derivados del amoníaco NH_3 al sustituir uno, dos o tres de sus hidrógenos por radicales alquílicos o aromáticos. Según el número de hidrógenos que se sustituyan se denominan aminas primarias, secundarias o terciarias. Forman enlaces de hidrógeno más débiles que los alcoholes, se comportan como bases a través del par libre electrones del nitrógeno. También se comportan como ácidos débiles, al perder un protón mediante el empleo de bases muy fuertes (Gutiérrez y col, 2010).

2875.0 cm^{-1} Alcano	1600 cm^{-1} Anillo aromático (fenol)	3300 cm^{-1} Alcohol primario	3445.5 cm^{-1} Amida primaria	3442.5 cm^{-1} Amina secundaria
-----------------------------------	---	---	---	---

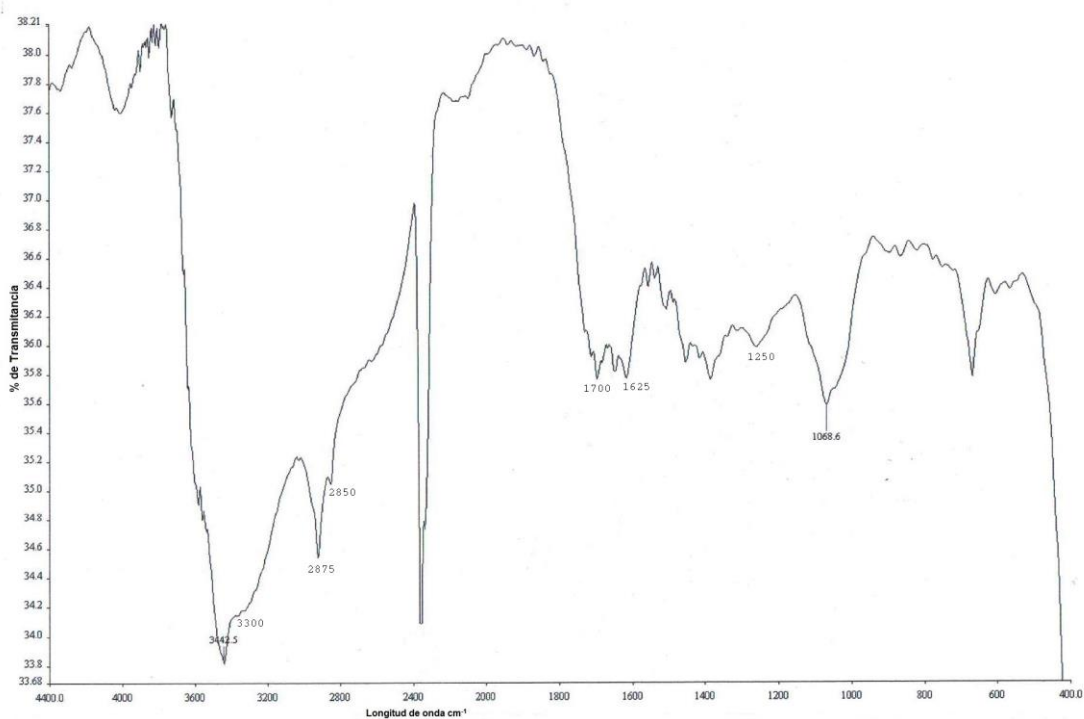


Figura 26. Espectro de infrarrojo del extracto de estróbilos *Pinus patula*.

Los compuestos orgánicos (terpenos, taninos y flavonoides), están conformados por grupos

funcionales de este extracto (amida, alcano, amina, alcohol primario y fenol, fig. 26), asignados a partir de un examen IR. Estos últimos posiblemente son los responsables del efecto antimicrobiano.

Interpretación del IR realizado al extracto de espigas *Plantago major L*

En la figura 27 se aprecia el espectro IR del extracto de espigas *Plantago major*, el grupo alcano en la longitud de onda a $2962\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$, se presenta una señal ancha a 2928.1 cm^{-1} se confirma este grupo; los alcanos son los hidrocarburos compuestos de carbono e hidrógeno formando enlaces simples, son compuestos saturados y poco reactivos, (Brown, 2007).

La amida se ubicó aproximadamente en 3500 cm^{-1} , y la primaria en $1700\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$, las señales a 1694.3 cm^{-1} , 1605.7 cm^{-1} , una amida en un derivado de un ácido carboxílico por sustitución de grupo oxidrilo (-OH) del ácido por un grupo -NH_2 , -NHR o -NR , R_2 llamado grupo amino. Existen tres tipos: primarias, secundarias y terciarias, dependiendo del grado de sustitución del átomo de nitrógeno (Brown, 2007).

El alcohol se ubicó en los 3300 cm^{-1} , y un alcohol primario en 1050 cm^{-1} , se asignó el grupo en 3300 cm^{-1} y con huella digital en 1041.4 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , los alcoholes son compuestos químicos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo(-OH), enlazado de forma covalente a un átomo de carbono. Pueden comportarse como ácidos o bases, se establece un dipolo muy parecido al que presenta la molécula de agua (Gutiérrez y col, 2010).

2928.2 cm ⁻¹	3300 cm ⁻¹	1697 cm ⁻¹
Alcano	Alcohol primario	Amina primaria

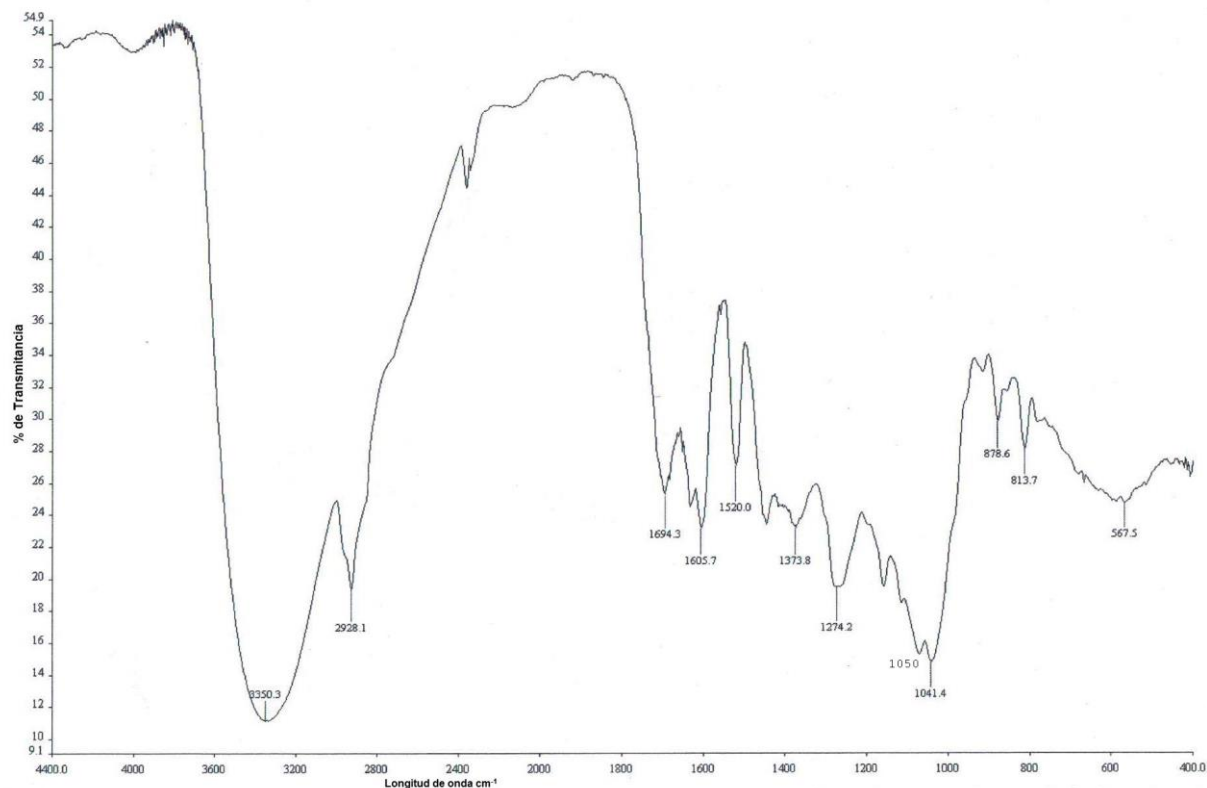


Figura 27. Espectro de infrarrojo del extracto de espigas *Plantago major*.

El extracto de espigas *Plantago major* presentó efecto antimicrobiano, posiblemente a los grupos funcionales (alcanos, amidas y alcoholes primarios), identificados a partir de un IR (figura 27), que forman parte de los compuestos orgánicos de los flavonoides y taninos descritos por Blanco y colaboradores en 2008.

En los extractos a partir de un examen IR y junto con las tablas de correlación se asignaron grupo funcionales, hubo grupos funcionales semejantes entre los tres extractos como alcano, alcohol primario y amida primaria, otros difieren tal como el extracto de estróbilos *Pinus patula* presento amina primaria y secundaria y un fenol (cuadro20).

Cuadro 30. Grupos funcionales identificados en los extractos.

Grupos funcionales						
Extracto	Alcano	Alcohol primario	Amida primaria	Amina primaria	Amina secundaria	Fenol
Inflorescencias						
<i>Gnaphalium viscosum</i>	X	X	X			
Espigas						
<i>Plantago major</i>	X	X	X			
Estróbilos						
<i>Pinus patula</i>	X	X	X	X	X	X
X= grupo presente						

5. Conclusiones

- ♣ Las tres especies estudiadas presentaron efecto antimicrobiano el extracto de *Gnaphalium viscosum* a nivel de inflorescencias, el extracto de *Pinus patula* a nivel de estróbilos y el extracto de *Plantago major* a nivel de espigas.
- ♣ La concentración mínima inhibitoria fue en *Gnaphalium viscosum* 30 mg/mL, para *Pinus patula* de 60 mg/mL y para *Plantago major* de 90 mg/mL.
- ♣ Se presentó mayor rendimiento el extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum* y menor rendimiento el extracto de estróbilos de *Pinus patula*.
- ♣ El efecto antimicrobiano se presentó en el extracto de inflorescencias de *Gnaphalium viscosum* para bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β-hemolítico*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium xerosis*), en el extracto de estróbilos de *Pinus patula* para bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y en el extracto de espigas de *Plantago major* para bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β-hemolítico*) y Gram negativas (*Escherichia coli*).
- ♣ En el extracto de inflorescencias *Gnaphalium viscosum* al aumentar las concentraciones aumenta la zona de inhibición, se necesitan más estudios para determinar cuál es la mejor concentración.
- ♣ En el extracto de estróbilos de *Pinus patula* al incrementar las concentraciones la zona de inhibición es del mismo tamaño, por lo que se puede utilizar la concentración de 60mg/mL, ya que es la menor concentración a la que se da este efecto.
- ♣ En el extracto de espigas de *Plantago major* al aumentar la concentración la zona de inhibición aumenta para *Enterococcus faecalis* y en las demás bacterias al aumentar la concentración el halo de inhibición es del mismo tamaño, se utilizaría la concentración de 90mg/mL, que es la menor cantidad a la cual se presentó este efecto.
- ♣ En el extracto de *Gnaphalium viscosum* se evaluó la toxicidad de la concentración de 30 mg/mL, encontrando que este extracto no es toxico.
- ♣ Se identificaron grupos funcionales a partir de un examen IR en los tres extractos, presentando grupos funcionales semejantes, cómo: alcano, alcohol primario y amida primaria, en el extracto de estróbilos de *Pinus patula* se identificaron, además de los anteriores, los grupos amina primaria y secundaria y un fenol. Porque se debe ahondar en el estudio de la influencia de esto grupos sobre el efecto microbiano.

6. Bibliografía

-Amaya, G.M.N; Toledo, G.S.L y Ruiz, G.C.A, 2008, "Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos por hidrodestilación de acículas de pinos, probados en *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*". *Avances de la investigación científica en Cuba*, 6(3):87-91.

-Azcon, J. B, 1993, "Fisiología y Bioquímica Vegetal", Interamericana, McGraw-Hill, España, 581 págs.

-Bailey, A.S y Scott, L.M; 2009, "Diagnóstico microbiológico", 12ª Edición, Editorial médica panamericana, Buenos aires, 1026 págs.

-Blanco.B, Saborío. A y Garro.G; 2008 "Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor)", *Tecnología en marcha*, 21(1):17-24.

-Brown, H.W, 2007, "Química orgánica", 2ª Edición, Grupo Editorial Patria, México, 519págs.

-Carroll, C. K, 2008, "Microbiología médica", Editorial el manual moderno, México, 828 pags.

-Cervantes, S. A, Marques, J. M y Rivera, G.P; 2006, "Análisis Estadístico, un enfoque práctico con Stat graphics", FES Zaragoza UNAM, 113 pags.

-Davicino.R, Mattar. M. A, Casali.Y.A, Correa.G. S, Pettenati. E.M y Micalizzi. B; 2007, "Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina", *Revista Perú de Biología*, 14(2): 247-251.

-Enciso, D.O. J, Alfonso Méndez, G.A, Hernández, D. L, Ashutosh, S, Villarreal, M.L, Alexandre Cardoso, T. A; 2012, "Antibacterial Activity of *Bougainvillea glabra*, *Eucalyptus globulus*, *Gnaphalium attenuatum*, and Propolis Collected in Mexico", *Pharmacology & Pharmacy*, 3(1):433-438.

-Fernández, A. C. V; Mendiola, M. J; Monzote, L. F; García, P. M; Sariego, A. R. S; Cull L. R y Gutiérrez, Y. G, 2009, "Evaluación de la toxicidad de las plantas cubanas con la posible acción parasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L", *Revista cubana de medicina tropical*, 61(3):1-7.

-Gamiño, V.C, 2009 "Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Phytolacca icosandra* L.", Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, 76 págs.

-González, F.R.M y Molina.L.J, 2009, "Microbiología bucal, 4ª edición, editorial Méndez editores, México, 388 págs.

-Grayer. R.J y Harborne, J .B; 1994, "A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993", *Phytochemistry*, USA, 37(1):19-42.

-Gutiérrez, F.M; López, C.L; Arrellano, P.L.M; González, O.A; 2009; "Química orgánica", Editorial Pearson Educación®, México, 560 págs.

- Gutiérrez, M; López, L; Arrellano, M.L y Ochoa, A; 2010, “Química orgánica”, 2ª Edición, Editorial Person, México, 560 págs.
- Harvey, A.R; Campe, C.P y Bruce, D.F, 2008, “Microbiología”, 2ª edición, editorial Wolters kluwer, China, 438 págs.
- Hewitt. W, 2004, “Microbiological assay for pharmaceutical analysis”, Interpharm/CRC, Washington, 244 págs.
- Keneth, J. R, 2005, “Microbiología médica”, 4ª edición, Editorial McGraw-Hill, México, 1060 págs.
- Lazcano.R.J.A y Vergara.G.J.L, 2008 “Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcisnthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos”, Pontificia universidad javiana, Colombia, 81págs.
- Levinson, W, 2004, “Microbiología e inmunología médica”, Interamericana, México, 662 págs.
- López, G. N, 2011, “Actividad biológica de cinco extractos vegetales sobre algunos fitopatogenos, poblaciones totales fúngicas y bacterianas del suelo”, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, 122 págs.
- Mata.S; 2015. “Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana” (disponible) <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> (Consulta 23 de Enero 2015).
- Martínez. S, Vela .A, Botero, A, Franz, A y Mollinedo, P, 2010, “Nuevo micro-bioensayo de ecotoxicidad de extractos acuosos de plantas medicinales sobre *Daphnia magna sp*”, *Revista boliviana de química*, 27(1):29-32.
- McFaddin, F. J, 2004, “Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia clínica”, Editorial Médica Panamericana, Argentina, 453 págs.
- Oluwadayo, S.O and Olakunle.K, 2008, “Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pinus caribae* from Nigeria”. *African Journal of Biotechnology*, 7 (4):2462-64.
- Özkalp, B and Özcan, M.M, 2009, “Antibacterial activity of extracted from *Pinus nigra* industry plant”, *Wordapbled sciencies jornal*, 6(5):669-73.
- Pradeau, D; 2001; “Químicos farmacéuticos de alimentos”, S.A de C.V grupo Noriega editores, México, 1130 págs.
- Ramírez .R.R.Y y Mojica .A. D.N, 2014, “Actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*”. *Revista Investig. Salud Univ. Boyacá*, 1(1): 63 – 71.

- Richard, A.H.D, Champec. C y Bruce.D.F, 2007, "Microbiología", 2ª Edición, Lippitt Williams & Wilkins, España, 438 págs.
- Romero, C. R; 2010 "Microbiología y parasitología humana", 3ª Edición, Editorial médica panamericana, México, 1003 págs.
- Ryan, J.K y Ray, C.G; 2010, "Microbiología médica", 5ª Edición, Mc Graw-Hill, México, 776 págs.
- Scott, C; 2003 "Clínica Mayo de la salud familiar", 3ª Edición, Editorial Trillas, México, 1448 págs.
- Sharifa, A. A; Neoh; Iswadi, L. M. I; Khairul, O; Abdul, H ;Jamaludin,M ; Mohamed A ; Azman, A. B and Hing, H.L; 2008, "Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of *Plantago major* on gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast", *Annuls microscopy*, 1(8): 42-44.
- Steinhoff, K.B y Blasius, R.H; 2010, "Herbal medicinal products", Medpharm, New York, 177 págs.
- Swapan, K.N y Sanjay G.R; 2009, "Microbiología clínica", El Sevier España, España, 528 pags.
- Trease y Evans, 1991, "Farmacognosia", 13ª Edición, Interamericana Mc Graw-Hill, México, 901págs.
- Vazquez, D.M.I; 2009, "Producción de mercado del Llantén como plantas medicinal en Texcoco estado de México", Universidad Autónoma de Chapingo, México, 80 págs.
- Waizel, H.S y Waizel B.J. 2009, "*Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma*". *An Orl Mex*, 54(4):145-71.
- Yasaki, K, Sugiyama. A, Morita .M y Shitan N, 2008, "Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites", *Phytochem Rev*, 1(7):513-24.
- Zaragoza,C.P,Cardona,G.C, García.P.J y Lletí.M.S, 2007, "Microbiología aplicada al paciente crítico", Editorial medica panamericana S.A, Madrid, 268págs.
- Zepeda, A.G, 2012, "Efecto antimicribiano y tóxico del extracto de *Archiella milletollum* L.", Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, 66págs.