



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

## VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA RESINA DE *Gymnosperma glutinosum* DE TRES DIFERENTES LOCALIDADES

# TESIS

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

**FERNANDA HATZIRI GARCÍA ARIAS**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. Ma. MARGARITA CANALES MARTINEZ

LOS REYES IXTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO 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.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

A la Dra. M. Margarita Canales Martínez. Por su apoyo incondicional

Al Jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Biol. Luis Barbo Hernández Portilla

Dra. María Margarita Canales Martínez

M. en C. Ángel Duran Díaz

M. en C. Karla Sthephanie Martínez Elizalde

Este trabajo fue financiado por:

PAPIIT IN211614 y IN213713

PAPCA 2014 (No. 9)

Los locos abren los caminos que más tarde recorren los sabios.

Carlo Dossi

## Dedicatorias

### A mi familia:

A mi madre, por ser siempre la columna vertebral de la familia, por haber formado a dos grandes mujeres que le deben la vida, por dejar todo para vernos brillar, porque sin ti "má", nada de esto sería posible, muchísimas gracias por enseñarme a soñar, a volar y a perseguir mis sueños por más locos que parezcan, por enseñarme que las cosas más grandes y bonitas cuestan, pero al final la recompensa es enorme. Este logro también es tuyo.

A mi abuelo, el mejor padre que se puede pedir en la vida, gracias por el apoyo incondicional, por el amor, la preocupación, los consejos y las enseñanzas a lo largo de estos años, porque tú has sido parte esencial de lo que he logrado y de la persona que soy hasta ahora. No hay tiempo para decir lo mucho que te agradezco. Te quiero mucho y nunca olvides que eres el hombre más importante en mi vida....."Tato".

A mi abuela Lola.

A mi hermana, porque sé que aunque te cuesta aceptarlo me quieres y te preocupas, eres una gran hermana y un modelo a seguir en muchos sentidos, gracias por estos años juntas. A ti también Chucho gracias.

A toda la familia Arias.

### Al laboratorio de Farmacognosia:

Dra. Margarita, gracias por permitirme ser parte de esta gran familia, por ser una gran persona, maestra y amiga. Gracias por siempre darnos la mano, por preocuparse por cada uno de nosotros en el laboratorio y por enseñarnos que todo lo que se hace con el corazón no cuesta trabajo..."La Fama Cuesta"

A Michael que además de ser un gran maestro y compañero, se volvió un gran amigo, gracias por todos esos días en el laboratorio, por tu apoyo y amistad.

A Ana, Rebe y Mara, por ser un gran ejemplo de mujeres luchonas, que a pesar de muchos obstáculos han demostrado que siempre hay luz hacia adelante, gracias por las pláticas, las risas y su apoyo (Son un gran ejemplo para mi chicas, las quiero). Gracias por brindarme su amistad.

A Karlita, Iván, Isa, Alicia, Esli, Marlene, Emmanuel, Manuel y Javier por ser un gran equipo de trabajo.

Al laboratorio de Inmunobiología:

Dr. Marco, por ser una gran persona y ejemplo a seguir, gracias por su apoyo y por permitirme ser parte de esto.

A Mario, que es una gran persona y amigo, gracias por siempre estar conmigo.

A Óscar, Nelly, Guss, Danny, Alonso, Rubén, Pili, Fanny, Mike y Lesslie.

A mis amigos:

Gaby y Karen: Gracias por rescatarme, acompañarme en esta gran aventura de la Biología, porque son mujeres que valen cada uno de los momentos que pasé con ustedes, gracias por aparecer en mi vida...."porque nos quiero ver crecer".

A Beba y Nora por su amistad de todos estos años, por que este sea uno de los muchos logros en los que nos acompañaremos.

Axel y Jonny, porque siempre han estado a pesar de todo, crecimos amigos.

A ti, porque no habría sido lo mismo este camino, esta aventura, esta historia... te agradezco por todas y cada una de las experiencias a lo largo de este viaje, por los buenos y los malos momentos, por la Biología y la locura... por este gran aprendizaje.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de figuras .....	8
Índice de cuadros.....	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
METODOLOGÍA.....	22
Obtención de las resinas.....	22
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	22
Evaluación cualitativa.....	22
Evaluación cuantitativa.....	23
Evaluación de la actividad antifúngica.....	23
Levaduras.....	23
Evaluación cualitativa.....	23
Hongos filamentosos.....	24
Evaluación cualitativa.....	24
Evaluación cuantitativa.....	24
Marcha fitoquímica.....	24
Determinación de fenoles totales .....	24
Determinación de flavonoides totales .....	25
Determinación de la capacidad antioxidante .....	25
Cromatografía líquida de alta resolución HPLC.....	25

Toxicidad general.....	25
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS.....	26
Rendimiento .....	26
Actividad antibacteriana .....	27
Evaluación cualitativa.....	27
Evaluación cuantitativa.....	29
Determinación de CMI y CBM .....	29
Actividad de las resinas sobre la curva de crecimiento bacteriano .....	30
Actividad antifúngica.....	34
Evaluación cualitativa .....	34
Evaluación cuantitativa.....	36
Toxicidad general.....	39
Capacidad antioxidante.....	40
Marcha fitoquímica.....	41
Determinación de fenoles totales .....	41
Determinación de flavonoides totales.....	36
Cromatografía líquida de alta resolución.....	42
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES .....	57
APÉNDICES .....	58
Apéndice 1 Descripción botánica.....	58
Apéndice 2 Zona de colecta .....	62
Apéndice 3 Método de extracción .....	64

Apéndice 4 Método de difusión en agar Kirby-Baüer.....	64
Apéndice 5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM).....	67
Apéndice 6 Cinética bacteriana .....	68
Apéndice 7 Inhibición del crecimiento radial.....	69
Apéndice 8 Método de toxicidad general .....	69
Apéndice 9 Método de reducción del radical 2,2- difenil- 1-picrilhidracil (DPPH) .....	71
Apéndice 10 Determinación de la concentración de fenoles totales .....	73
Apéndice 11 Cuantificación de flavonoides totales .....	75
Apéndice 12 Antibiograma.....	77
REFERENCIAS.....	78



## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Fig 1. Algunos mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	14
Fig 2. Mecanismos de resistencia de los hongos .....	16
Fig 3. Clasificación y número de estructuras que se conocen de los metabolitos secundarios de plantas .....	18
Fig 4. Rendimiento de las resinas de <i>G. glutinosum</i> .....	26
Fig 5. Actividad de las resinas sobre bacterias Gram positivas .....	28
Fig 6. Actividad de las resinas sobre bacterias Gram negativas .....	28
Fig 7. Diagrama de cajas de la variación de los halos de inhibición de las tres muestras de las resinas sobre bacterias.....	29
Fig 8. Actividad de la resina de Tepeji del Rio, Hidalgo sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
Fig 9. Actividad de la resina de San Rafael Coxcatlán, Puebla sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
Fig 10. Actividad de la resina de Las Monjas Zapotitlán, Puebla sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
Fig 11. Actividad de la resina de Tepeji del Rio, Hidalgo sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>Pantoea agglomerans</i> .....	33
Fig 12. Actividad de la resina de San Rafael Coxcatlán, Puebla sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>Pantoea agglomerans</i> .....	33
Fig 13. Actividad de las tres resinas sobre <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i> .....	34
Fig. 14. Diagrama de cajas de la comparación de la variación de los halos de inhibición de las tres resinas sobre candidas .....	35
Fig 15. Concentración letal media sobre larvas de <i>A. salina</i> .....	40
Fig 16. Picos de absorción y tiempos de retención de la resina de Tepeji .....	43
Fig 17. Picos de absorción y tiempos de retención de la resina de Zapotitlán.....	46
Fig 18. Picos de absorción y tiempos de retención de la resina de San Rafael ...	49

Fig 19. Flores de <i>G. glutinosum</i> (Spreng) Less .....	60
Fig 20. Flores de <i>G. glutinosum</i> (Spreng) Less.....	61
Fig 21. Zonas de colecta.....	63
Fig 22. Actividad antioxidante de la resina de San Rafael Coxcatlán, Puebla.....	72
Fig 23. Actividad antioxidante de la resina de Tepeji del Rio, Hidalgo.....	72
Fig 24. Actividad antioxidante de la resina de Las monjas Zapotitlán, Puebla.....	73
Fig 25. Curva patrón de ácido gálico.....	75
Cuadro 1. Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos.....	13
Cuadro 2. Rendimiento de las resinas obtenidas de <i>G. glutinosum</i> .....	26
Cuadro 3. Actividad antibacteriana de las resinas de <i>G. glutinosum</i> .....	27
Cuadro 4. Actividad antibacteriana de las resinas de <i>G. glutinosum</i> .....	30
Cuadro 5. Actividad de las resinas sobre candidas .....	33
Cuadro 6. Actividad de las resinas sobre hongos filamentosos.....	36
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición y CF <sub>50</sub> de las tres resinas sobre <i>F. sporotrichioides</i> .....	36
Cuadro 8. Porcentajes de inhibición y CF <sub>50</sub> de las tres resinas sobre <i>F. moniliforme</i> .....	37
Cuadro 9. Porcentajes de inhibición y CF <sub>50</sub> de las tres resinas sobre <i>T. mentagrophytes</i> .....	37
Cuadro 10. Porcentajes de inhibición y CF <sub>50</sub> de las tres resinas sobre <i>Aspergillus sp.</i> .....	38
Cuadro 11. Porcentajes de inhibición y CF <sub>50</sub> de las tres resinas sobre <i>A. niger</i> ....	39
Cuadro 12. Porcentajes de inhibición y CF <sub>50</sub> de las tres resinas sobre <i>R. lilacina</i> .	39
Cuadro 13. Concentración letal media de las resinas de sobre larvas nauplio de <i>Artemia salina</i> .....	40
Cuadro 14. Capacidad antioxidante.....	41

Cuadro 15. Determinación de fenoles totales.....	41
Cuadro 16. Determinación de flavonoides totales.....	42
Cuadro 17. Tiempo de retención y UV máxima de la resina de Tepeji.....	44
Cuadro 18. Tiempo de retención y UV máxima de la resina de Zapotitlán .....	47
Cuadro 19. Tiempo de retención y UV máxima de la resina de San Rafael .....	50
Cuadro 20. Clasificación botánica de <i>G. glutinosum</i> .....	59
Cuadro 21. Curva patrón para la determinación de fenoles totales .....	74
Cuadro 22. Antibiograma bacterias Gram positivas.....	77
Cuadro 23. Antibiograma bacterias Gram negativas .....	77

## RESUMEN

México por ser un país mega diverso, cuenta con una amplia variedad de plantas con metabolitos secundarios útiles para el ser humano, es por esto que largo de los años se han empleado para el cuidado y tratamiento de enfermedades; dentro de este grupo de plantas empleadas en la medicina tradicional encontramos a *Gymnosperma glutinosum* a la que se le ha dado un uso contra enfermedades gastro intestinales en diferentes estados del país.

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar y validar el uso antimicrobiano de la resina de *Gymnosperma glutinosum* de tres diferentes localidades (San Rafael Coxcatlán, Puebla, Las Monjas Zapotitlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo). Para ello se evaluó la actividad antibacteriana utilizando bacterias Gram positivas y Gram negativas, sobre las que se realizaron ensayos cualitativos, en donde las tres resinas actuaron sobre 7 cepas, y pruebas cuantitativas en las que *S. aureus*, *S. epidermis* y *S. epidermis* fueron las cepas más sensibles presentando valores de CMI y CBM entre 0.75 y 1.25 mg/mL para las tres resinas. Se determinó la actividad de las resinas sobre la curva de crecimiento bacteriano de *S. aureus* en la que la resina de Tepeji tuvo actividad bactericida y sobre *P. agglomerans* en las que la resinas de Tepeji y San Rafael tuvieron actividad bacteriostática durante las primeras horas. De la misma forma se evaluó la actividad antifúngica con pruebas cualitativas sobre seis levaduras en las que sólo se observó actividad sobre *C. albicans* y *C. tropicalis* y seis hongos filamentosos, de éstos últimos *F. moniliforme*, *T mentagrophytes* y *R. lilacina* fueron los hongos más sensibles a las tres resinas presentando una inhibición del crecimiento mayor al 50% desde la primera concentración ensayada. Se realizó un ensayo de toxicidad general con larvas nauplio II de *Artemia salina*, las tres resinas presentaron toxicidad alta. Para determinar su fitoquímica se realizaron pruebas de fenoles en el que la resina de San Rafael presenta mayor contenido con 45.18 mg eAG/g, flavonoides totales en los que la resina de Tepeji obtuvo mayor concentración con 3.518 mg eQ/g, así como la capacidad antioxidante en la que la resina de Tepeji presenta mayor CA<sub>50</sub> de 28.79 mg/mL. Por último se realizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el que las tres resinas presentaron fenoles y flavonoides en su mayoría, cabe resaltar la presencia de una flavanona (pinocembrina) con importante actividad biológica.

Los resultados obtenidos corroboran el uso antimicrobiano de la resina *G. glutinosum*.

## INTRODUCCIÓN

Un antibiótico se puede definir como un producto del metabolismo microbiano que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos y además es efectivo a bajas concentraciones (Mateos, 2010). Estos suelen considerarse como fármacos «sociales» debido a las amplias consecuencias que tiene su uso individual en los contactos del paciente con la comunidad local. Hasta los tiempos modernos, las infecciones por microorganismos como las bacterias, hongos, parásitos y virus eran la principal causa de muerte del ser humano, y lo siguen siendo en entornos con escasos recursos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2014). Dentro del amplio espectro de medicamentos que se han empleado para tratar estas infecciones se encuentran los antimicrobianos que constituyen dos grupos de fármacos que son por un lado los quimioterapéuticos, obtenidos de síntesis orgánica y por otro lado los antibióticos que son naturales. Ambos se caracterizan por poseer toxicidad selectiva; es decir, que no afectan o son relativamente inocuos para las células del hospedador (Chambers, 2007); Las enormes diferencias que existen entre las células bacterianas y las células de los mamíferos, hacen que, en muchas oportunidades los blancos de los antimicrobianos en una bacteria, no existan en las células del hospedador o, en todo caso, que esos blancos sean suficientemente distintos como para que las diferencias en afinidad sean tan marcadas que expliquen la acción selectiva sobre la bacteria y las poblaciones microbianas de todo el mundo. (Errecalde, 2004 y OMS, 2014)

Los antibióticos se han usado como promotores del crecimiento de animales y para el tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en las personas como en los animales por tener un efecto bactericida (causando la muerte) o bacteriostático (inhibiendo el crecimiento) sobre el patógeno que se pretende erradicar (Torres, 2012). Sin embargo, luego de que su uso se generalizara en la medicina, rápidamente se aislaron patógenos humanos que expresaron resistencia a estos agentes y algunos otros se volvieron resistentes a muchas drogas que originalmente eran efectivas (Gómez, 2011). Por ejemplo *Staphylococcus aureus* desarrolló resistencia a la penicilina a través de la producción de beta-lactamasas desde 1954. Esto llevó a la disminución rápida de la utilidad de la penicilina en infecciones por estafilococos, especialmente entre pacientes hospitalizados, donde las cepas frecuentemente se encuentran antes que se diseminen a la comunidad (Gold, 1996), y como éste, existen varios ejemplos de antimicrobianos de los que ya se ha reportado resistencia, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos (Errecalde, 2004).

Droga	Descubrimiento	Uso clínico	Resistencia clínica
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

Los patrones de resistencia a los antimicrobianos varía en todo el mundo, aún en distintas zonas de un mismo país y también según las instituciones, y lo anterior se debe a los variados usos de éstos. Por eso, la resistencia es un problema local, seguramente está relacionado con las cantidades de antimicrobiano que se usan en el hospital y a la atención que se presenta al control de infecciones (Gómez, 2011).

Un antibiótico necesita alcanzar su mayor acción en una concentración suficiente y durante el tiempo adecuado, para poder inhibir el crecimiento o causar la muerte de la bacteria. Las bacterias pueden utilizar diferentes mecanismos generales para hacerse resistentes a la acción de los antibióticos (Torres, 2012).

- 1) Evitar que el antibiótico entre en la bacteria. En este sentido, las bacterias pueden modificar su pared celular o su membrana haciéndola impermeable a la entrada del antibiótico
- 2) Producir enzimas que modifican o inactivan al antibiótico.
- 3) Modificar el rango de acción del antibiótico, de tal manera que este compuesto no pueda ejercer su acción inhibitoria
- 4) Expulsar el antibiótico al exterior de la bacteria, a través de la actuación de unas bombas de flujo, que eliminan el antibiótico fuera de la célula evitando la interacción entre la bacteria y el antimicrobiano

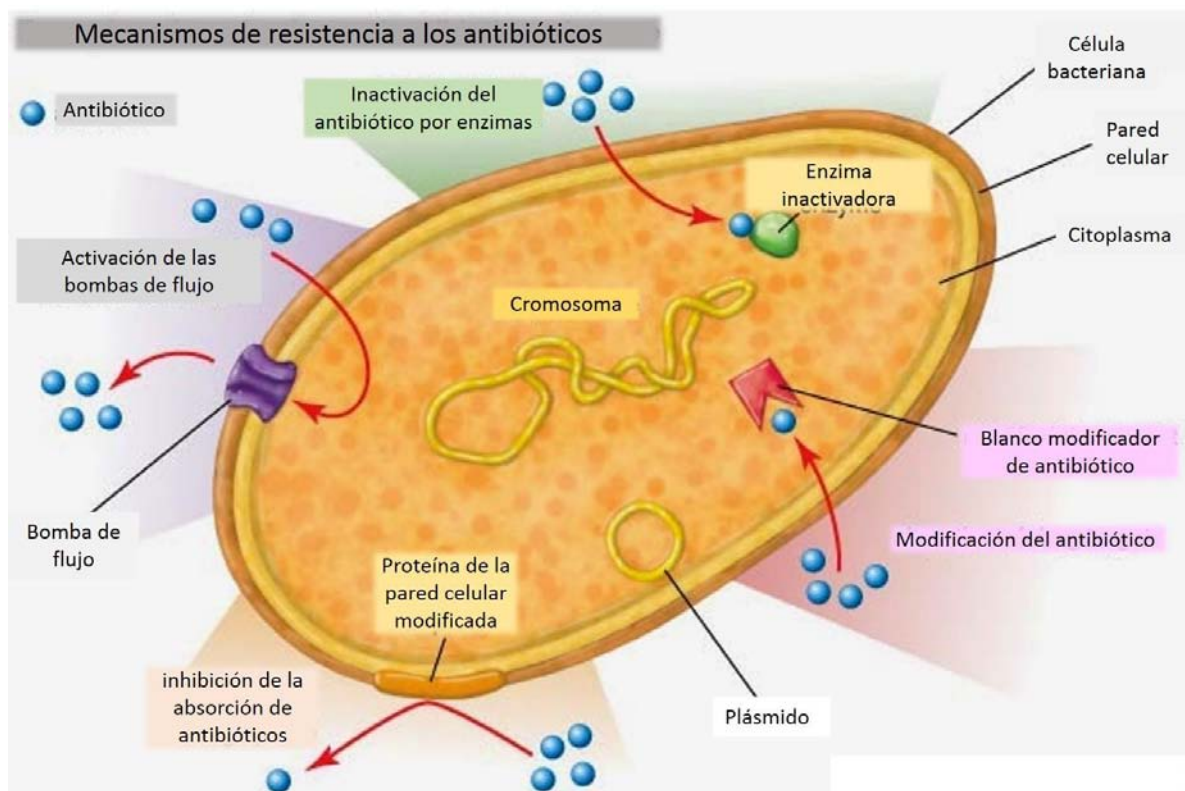


Fig 1. Algunos mecanismos de resistencia a los antibióticos

Por otro lado, los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias pueden ser de naturaleza intrínseca (es decir, lo poseen todas las bacterias de la misma especie o grupo bacteriano de manera innata) o bien de manera adquirida (sólo lo poseen ciertas bacterias de la especie e implica adquisición de los mismos) (Torres, 2012).

Las estrategias que utilizan las bacterias para hacerse resistentes o adquirir nuevos mecanismos de resistencia son:

**Mutaciones:** en su genoma o en el material genético extracromosomal preexistente, generando nuevos genes de resistencia. Desde el punto de vista evolutivo, las mutaciones supondrían no sólo “un error útil”, sino una estrategia evolutiva de adaptación (Amoroso et al., 2006 y Gómez, 2011). Hoy día se sabe que los antibióticos no se limitan a favorecer la selección de bacterias resistentes a los mismos, sino que también son capaces de incrementar la tasa de mutación de las bacterias, acelerando la variabilidad genética y aumentando, por tanto, las posibilidades de adquisición de resistencia (Baquero et al., 2001).

**Adquisición y movilización de genes de resistencia exógenos mediante determinadas plataformas genéticas:**

por lo general, la resistencia farmacológica se adquiere por transferencia horizontal de una célula donadora por uno de conjugación, transducción y transformación. Este tipo de transferencia se extiende con rapidez, por propagación clonal de la cepa resistente o por transferencias subsecuentes hacia otras cepas sensibles (Chambers, 2006). La más relevante en pacientes hospitalizados es la conjugación.

La conjugación es la transferencia de genes por contacto entre dos células a través de un puente sexual (pilus). Este mecanismo es muy importante puesto que es posible transferir varios genes de resistencia en un sólo evento a través de un plásmido conjugativo (Chambers, 2007).

En la transducción, el ADN de la célula donadora penetra en la célula receptora por infección viral. Cuando el ADN posee un gen de resistencia farmacológica, la célula bacteriana recién infectada adquiere la resistencia.

El proceso de transformación involucra la captación e incorporación en el genoma de la bacteria receptora del ADN desnudo liberado en el ambiente por otras células bacterianas (Passerini de Rossi, 2007).

Con todo lo antes mencionado, se sabe que la resistencia bacteriana a los antibióticos es un hecho conocido desde hace más de 50 años. Respecto a los hongos, este fenómeno era poco frecuente en los ochenta del siglo pasado (Hudson, 2001). De esta forma, el desarrollo de los fármacos antifúngicos se inició más tardíamente y de manera más lenta si se compara con el de los antibacterianos. Esto estuvo dado por la poca relevancia que tenían las enfermedades fúngicas y a la dificultad que representaba y aún representa lograr un fármaco con efectividad frente a las células fúngicas, además ser inocuo a la célula del huésped (mamífero) debido a que ambos son eucariotas, por tanto tienen gran similitud en cuanto a estructura y función biológica celular (Sheehan et al., 1999).

Durante muchos años, los compuestos antimicóticos fueron escasos y poco efectivos. Para el tratamiento de las micosis superficiales se contaba únicamente con griseofulvina y nistatina. A partir de mediados del siglo pasado, la comercialización de anfotericina B, aunque tóxica, ayudó de manera importante en el tratamiento de micosis sistémicas (Chapman, 2003). Con el advenimiento de los azoles tópicos como el miconazol y clotrimazol, y posteriormente los azoles sistémicos como ketoconazol, itraconazol, fluconazol y voriconazol, el tratamiento de las micosis superficiales y sistémicas se simplificó, mejorando las expectativas de curación en estas infecciones (Fromtling, 1988).



El creciente interés hacia los antifúngicos, fue gracias al aumento de las enfermedades fungosas que están estrechamente vinculadas a cambios producidos en la práctica médica como son: uso de fármacos que producen inmunosupresión (quimioterapia contra el cáncer, tratamiento con esteroides, tratamiento con inmunosupresores en pacientes con trasplantes de órganos), uso frecuente y a veces indiscriminado de antibióticos de amplio espectro que elimina la flora normal y el uso de catéteres intravenosos (Sevilla et al., 1998 ; Marr et al., 2002). Todo esto ha hecho que los hongos sean considerados patógenos de importancia.

Aunado a esto, el uso profiláctico de antimicóticos durante largos periodos en pacientes con inmunosupresión, ha manifestado el riesgo de aparición de cepas resistentes en hongos causantes de micosis sistémicas, y también en agentes de micosis superficiales como las onicomicosis (Evans, 1998). La resistencia clínica que han creado estos organismos puede definirse como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección (Mellado et al., 2002).

En términos generales, los mecanismos identificados hasta ahora, por los que una célula inicialmente sensible se hace refractaria a agentes citotóxicos (fig.2) son:

- 1) Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior.
- 2) Cambios en la interacción fármaco-diana (aumento del número de copias de la diana o modificaciones debido a mutaciones) .
- 3) Modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas.
- 4) Alteraciones en el procesamiento intracelular (degradación o modificación) del fármaco.

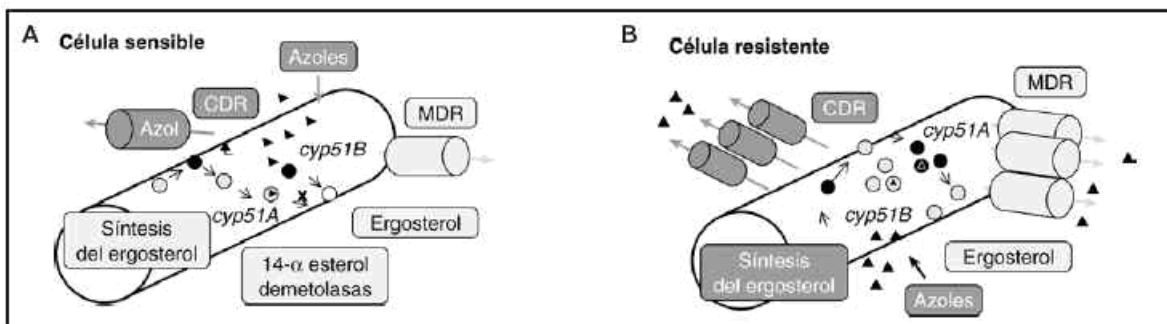


Fig 2. Mecanismos de resistencia de los hongos frente a los antibióticos A) El hongo sensible el antifúngico interactúa con la diana (14- $\alpha$  esteroles demetilasa, producto del gen CYP51) bloqueando la síntesis de ergosterol e inhibiendo el crecimiento del mismo B) El hongo resistente puede defenderse: aumentando las bombas de eliminación activas (MDR y CDR), lo que disminuirá la concentración intracelular del fármaco; aumentando el número de copias de la diana (CYP51A y/o CYP51B) o modificando la diana (mutaciones de los genes CYP51A y/o CYP51B de forma que la interacción del fármaco con la diana sea ineficiente).

A pesar de que son pocas las observaciones que se han registrado, una cepa podría presentar más de uno de estos mecanismos, lo que explicaría la multiresistencia desarrollada en algunos hongos (Carrillo-Muñoz, 1997).

De modo preventivo se han constituido diversas instituciones para detectar y controlar oportunamente estos casos, como un programa de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos creado por la OMS, el Consejo Mundial de Resistencia a Antibióticos (Global Advisory on Antibiotic Resistance Data, GAARD), iniciativa de la Alianza para el Uso Prudente de Antibióticos (Alliance for the Prudent Use of Antibiotics, APUA) entre otras (Gómez, 2011).

Como una alternativa a esta problemática, el empleo de sustancias naturales para el tratamiento de diversas enfermedades, podría resultar beneficiosa. A pesar de que muchos microorganismos brindan ciertas características para tratar estas infecciones, el reino vegetal es el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas.

Se estima que en la parte aérea de la planta, especialmente en las hojas existen alrededor de  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> ( $10^8$  células/g) de microorganismos principalmente bacterias (Andrews y Harris, 2000) que han llegado a formar parte de la ecología vegetal, estableciéndose en equilibrio gracias a que las plantas producen más de 100,000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios (Dixon, 2001), que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales (Domingo y López-Brea, 2003).

Así pues, las heridas que se producen tanto por la depredación por insectos como por el daño mecánico inducido por factores físicos, son condiciones que se traducen en una respuesta de defensa de la planta, la cual involucra la activación transcripcional de diversos genes de proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y la prevención de invasión de microorganismos patógenos. Estos genes codifican para proteínas involucradas en: a) en la formación de la pared celular,

como son la calosa, lignina, y las proteínas ricas en hidroxiprolina, b) la producción de inhibidores de proteasas y de enzimas líticas tales como las quitinasas y glucanasas, y **c) la síntesis de metabolitos secundarias con actividad antimicrobiana y/o antioxidantes** (Peña-Cortés & Willmitzer, 1995).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que además de tener importancia ecológica son producidos cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas como depredación, ataque por microorganismos y competencia por suelo, luz y nutrientes (Sepúlveda- Jiménez, 2003).

A lo largo de los años se han llegado a conocer más de 20 mil estructuras de metabolitos secundarios (Sepúlveda-Jiménez, 2003) que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los nitrogenados incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenos, poliacetilenos, policetilenos y fenilpropanoides. Como se muestra en la Fig 3.

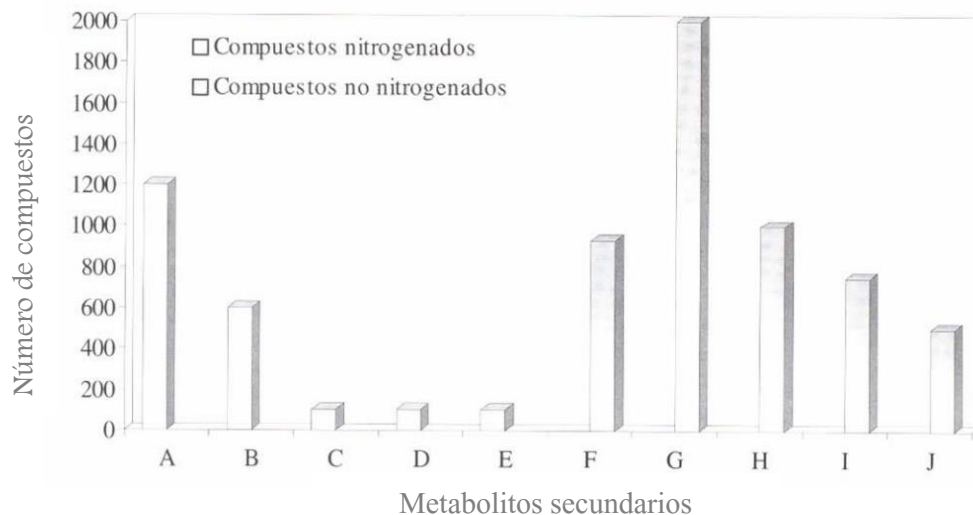


Fig 3. Clasificación y número de estructuras que se conocen de los metabolitos secundarios de plantas. Compuestos nitrogenados: A, alcaloides; B, aminoácidos no proteicos; C, aminas; D, glucósidos cianogénicos; E, glucosinolatos. Compuestos no nitrogenados: G, terpenos; H, flavonoides; I, poliacetilenos; J, plicétidos; K, fenilpropanoides (Sepúlveda-Jiménez, 2003).

Las muchas y diversas formas de los productos medicinales tradicionales han evolucionado frente a entornos ampliamente diferentes en lo etnológico, cultural, climático, geográfico y aun filosófico.

Gracias a esto, las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no sólo cuando los constituyentes de las plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. Por consiguiente, la reglamentación de la explotación y la exportación, junto con la cooperación y la coordinación internacional, son esenciales para su conservación a fin de asegurar su disponibilidad para el futuro (López, 2012).

Nuestro país cuenta con una gran diversidad de especies vegetales siendo así que el total de la flora fanerógama de México que se calcula en forma aproximada es de 220 familias, con 2410 géneros y 30,000 especies de las que 3.352 son conocidas como medicinales (Lock, 1994)

Actualmente para México se tienen reportadas aproximadamente 5,000 plantas medicinales, de las cuales el 25% son nativas de nuestro país, pero solamente el 16 % han sido estudiadas por un farmacólogo, el resto no cuenta con estudios químicos o farmacológicos que avalen científicamente las propiedades que se les atribuyen en la medicina tradicional (Cebrian et al., 2002)

Aún falta por realizar investigaciones sobre plantas que pueden ser fuente de nuevas drogas, puesto que sólo un pequeño porcentaje se ha investigado fitoquímicamente y la fracción sometida a pruebas es todavía menor (Hamburger y Hostettman, 1991)

Por esta razón en el presente estudio se emplea una planta con poco conocimiento de su fitoquímica pero que representa una opción terapéutica en diferentes zonas del país para tratar enfermedades como reumatismo, dolor de pies y diarrea entre otras. *Gymnosperma glutinosum* Less (Apéndice 1) conocida comúnmente como Popote o Tatalecho y recomendada por la medicina tradicional popular, se tiene el antecedente de algunos estudios de extractos metanólicos y hexánicos pero sólo uno sobre la resina para comprobar su actividad amebicida

## **ANTECEDENTES**

*Gymnosperma glutinosum* ha sido principalmente reportada en estudios florísticos hechos en diversas regiones del país, tal es el caso de Romero (1982), Castilla (1983), Núñez (1990), Rocha (2002), Reyes (1993), Zavaleta (1996), Tenorio

(1997), Díaz (1997); Sánchez (1998), Royo (2001), quienes evaluaron parámetros como forma de vida, abundancia y distribución de la planta, ellos coinciden en que esta especie se encontró principalmente en matorral xerófilo y pastizal generalmente en zonas perturbadas (Serrano, 2004).

Martínez (1967) reporta en la planta, aceites esenciales, resina ácida y neutra, ácido orgánico no determinado, ácido análogo al gálico, colorantes, azúcar, albúmina, goma, principios pécticos y sales minerales en tallos y flores.

Los compuestos químicos que se han aislado de la parte aérea de la planta incluyen principalmente flavonoides, de los cuales 7 fueron reportados por primera vez. Horie y colaboradores (1998) utilizaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$  para elucidar la estructura química de 5 flavonas. El ácido ent-dihidrotucumanoico y el ácido 2-angeloil ent-dihidrotucumanoico fueron elucidados por Martínez y colaboradores en 1994 mediante técnicas de espectroscopia y análisis de difracción de rayos X. Este mismo método fue utilizado para corroborar la estructura de los diterpenos (+) ent-labd-7-en-13S,14R,15-triol y el ácido (-)-17-hidroxineo-clerod-3-en-15-oico cuyas estructuras se establecieron en un principio por transformaciones químicas y espectroscopia (Maldonado et al., 1994)

Actualmente se ha demostrado que el extracto hexánico de *G. glutinosum*, presenta una alta actividad antimicrobiana (Canales et al., 2007). Se ha probado en bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea* y *Bacillus subtilis*) y en Gram-negativas (*Vibrio cholerae*, aislada de un caso clínico, *V. cholerae* No-01, *V. cholerae* aislada de agua, *V. cholerae* Tor, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Shigella boydii*) (Serrano, 2004; Canales et al., 2005). Así mismo se ha comprobado que la flavonona Eriodictiol presente en la resina de *G. glutinosum* tiene actividad sobre *N. fowleri* y que puede ser utilizada in vitro como amebicida (Peña, 2009).

Tomando como base los estudios antes mencionados y para comparar la actividad antimicrobiana de la resina de *Gymosperma glutinosum* colectada en tres diferentes localidades (San Rafael Coxcatlán, Puebla, Las Monjas Zapotitlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo), con la finalidad de contribuir al conocimiento medicinal de esta especie, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar la actividad antibacteriana de la resina de *Gymnosperma glutinosum* de tres localidades: San Rafael Coxcatlán, Puebla, Las Monjas Zapotitlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Con plantas de *G. glutinosum* de tres sitios de colecta (San Rafael Coxcatlán, Puebla, Las Monjas Zapotitlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo.):

1. Evaluar y comparar la actividad antimicrobiana de las resinas de *G. glutinosum* (método de difusión en agar Kirby Baüer e inhibición del crecimiento radial).
2. Evaluar y comparar la toxicidad general de las resinas de *G. glutinosum* (Ensayo de toxicidad general sobre *Artemia salina*).
3. Cuantificar y comparar la actividad antioxidante de las resinas de *G. glutinosum* (método de reducción de DPPH).
4. Determinar y comparar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM) por el método de microdilución en caldo de las resinas.
5. Determinar y comparar la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) y la concentración fungicida mínima (CFM) de las resinas de *G. glutinosum*.
6. Determinar y comparar el perfil químico (concentración de fenoles, concentración de flavonoides, HPLC) de las resinas de *G. glutinosum*.

## METODOLOGÍA

### 1. ZONA DE COLECTA

Plantas de *G. glutinosum* fueron colectadas en: San Rafael Coxcatlán, Puebla, Las Monjas Zapotitlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo (Apéndice 2).

### 2. OBTENCIÓN DE LAS RESINAS.

Las resinas se obtuvieron de la parte aérea de la planta fresca, se utilizó 1.572 Kg de *G. glutinosum* de la localidad de Zapotitlán, 0.716 Kg de la localidad de San Rafael y 3.5 Kg de Tepeji del Río una vez cortadas en pedazos pequeños se obtuvieron las resinas mediante la técnica de inmersión rápida en cloroformo (Apéndice 3).

### 3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Microorganismos a utilizar

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se emplearon los siguientes microorganismos:

Cepas bacterianas.

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* aislada de un caso clínico donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano), *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Vibrio cholerae* CDC V12, *Yersinia enterocolitica*, fue donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM) y *Escherichia coli* ATCC 53218, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, aisladas de casos clínicos, donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano).

#### Evaluación cualitativa

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991). Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Cloramfenicol (25 µg por disco). Los discos se impregnaron con 2 mg de la resina a probar. Como controles negativos se utilizaron sensidiscos con el solvente empleado (10µL) para evitar errores en los resultados y comprobar que no tienen ningún efecto sobre los microorganismos. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 4).

#### Evaluación cuantitativa

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó la técnica de microdilución en caldo (Koneman, 1985). Las concentraciones empleadas para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 6.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL (Apéndice 5).

#### Efecto del extracto activo sobre la curva del crecimiento bacteriano

El estudio se determinó de acuerdo al método propuesto por Kubo y colaboradores (Muroi et al., 1993). Las concentraciones evaluadas fueron ½ CMI, CMI y CBM de las resinas y se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento bacteriano durante 24 horas (Apéndice 6).

### 4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Para la evaluación de la actividad antifúngica se utilizaron las siguientes cepas de hongos:

#### Levaduras:

*Candida albicans* (donada por el laboratorio de análisis clínicos FESI), *Candida albicans* ATCC 32354 (donada por el laboratorio de análisis clínicos FESI), *Candida glabrata* CDBB-L-1536 (cepario del CINVESTAV), *Candida tropicalis* (donada por el Hospital los Angeles), *Candida albicans* CDBB-L-1003 (cepario del CINVESTAV) y *Criptococcus neoformans* (laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM).

#### Hongos filamentosos:

*Fusarium sporotrichioides* ATCC NRLL3299 (donada por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO de la FES Iztacala), *Fusarium moniliforma* CDBB-H-265, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112 (cepario del CINVESTAV),



*Aspergillus sp.* (donada por Dr. Rodolfo de la Torre Almazar, Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO, FES Iztacala) , *Aspergillus niger* CDBB-H-179, *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306 (cepario del CINVESTAV).

## LEVADURAS

### Prueba cualitativa

La actividad antifúngica sobre levaduras se evaluó de acuerdo al método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991). Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Nistatina (25 µg por disco). Los discos fueron impregnados con 4 mg del extracto a probar. Como controles negativos se utilizaron sensidiscos con el solvente empleado (10µL) para evitar errores en los resultados y comprobar que no tuvieran ningún efecto sobre los microorganismos. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 4).

## HONGOS FILAMENTOSOS

### Evaluación cualitativa.

Para el análisis cualitativo se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial usando una concentración de 2 mg por disco del extracto a probar, como control positivo Ketoconazol (5 µg) y cómo control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10µL de metanol (Wang y Bun, 2002) (Apéndice 7).

### Evaluación cuantitativa.

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) y la concentración fungicida mínima (CFM), se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun, (2002). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00 mg/mL., cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 7).

## 5. MARCHA FITOQUÍMICA

### Determinación de fenoles totales

Por el método modificado de Singleton y colaboradores, 1999. La concentración de fenoles totales se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando el reactivo de Follin-Ciocalteu como agente oxidante (Apéndice 10).

#### Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales de las resinas de *G. glutinosum* se determinó usando una curva patrón de quercetina (0-100 mg/L) y  $\text{AlCl}_3$  como indicador de flavonoides (Apéndice 11).

#### Determinación de capacidad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) método modificado de Murillo, 2006 (Apéndice 9).

#### Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La caracterización preliminar se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 $\mu\text{m}$ . Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (25-25-50), flujo de 1mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm).

### 6. TOXICIDAD GENERAL

La toxicidad general se evaluó a las tres resinas. Los ensayos se realizaron con larvas nauplio II de *Artemia salina*, siguiendo el método de McLaughlin (1991), a concentraciones de 1000, 100 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 8).

### 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los datos obtenidos en las pruebas cualitativas bacterianas fueron calculadas las siguientes medidas descriptivas: mediana, cuartil 1 (q1), cuartil 3 (q3), máximo y mínimo por medio de la obtención de los diagramas de cajas, para conocer la variación que existe entre cepas y resinas.

Para determinar si existieron o no diferencias significativas entre las resinas y cepas, se utilizó un análisis de varianza factorial, en el cual los factores considerados fueron: cepas y resinas.

Todo el análisis se realizó con el paquete de cómputo estadístico Minitab versión 17.

## RESULTADOS

### Rendimiento de extractos

En el cuadro 1 y figura 4 se observa que la resina con mayor rendimiento fue la de San Rafael con 16%, a diferencia de la resina de Tepeji que presentó el menor con sólo 3.7% y la de Zapotitlán resultó con 4.99% de rendimiento.

Cuadro 2. Rendimiento de las resinas obtenidas de *G. glutinosum*.

RESINA	RENDIMIENTO (g)	RENDIMIENTO (%)
San Rafael	114.64	16.00%
Zapotitlán	78.46	4.99%
Tepeji	130	3.71%

Los rendimientos fueron calculados con 716.3 g de planta fresca para la resina de San Rafael, 1572.1 g para la de Zapotitlán y 3500 g para la resina de Tepeji.

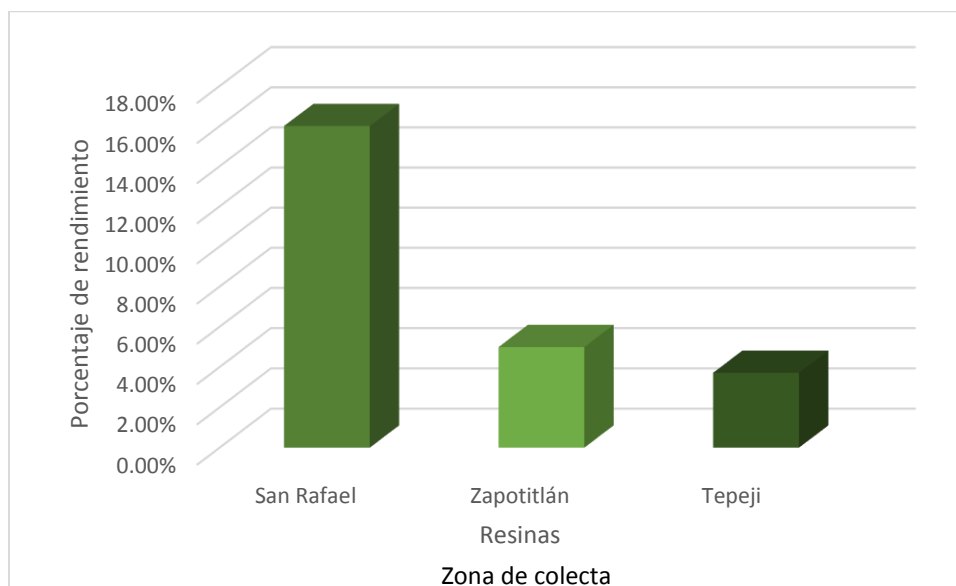


Figura 4. Rendimiento de las resinas de *G. glutinosum*

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

### Evaluación cualitativa

De las trece cepas bacterianas empleadas para el ensayo, las tres resinas tuvieron actividad sobre siete cepas, *S. aureus*, *S. epidermis* ATCC, *S. epidermis* FESI-C, *A. viscosus*, *P. aeruginosa*, *P. agglomerans*, *S. typhi*. La bacteria que presentó los mayores halos de inhibición con la resina de Tepeji fue *S. typhi*, presentando con una media de 10.33 mm; para la resina de San Rafael fue la cepa de *Pantoea agglomerans* con una media de 11 mm en los halos de inhibición y para la resina de Zapotitlán fue *S. aureus* con una media de 9.67 mm. Como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Actividad antibacteriana de las resinas de *G. glutinosum*

Bacterias	Tepeji	San Rafael	Zapotitlán
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.50 ± 1.80	9.17 ± 1.44	9.67 ± 1.15
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC	7.67 ± 0.58	9.50 ± 0.87	9.33 ± 1.53
<i>Staphylococcus epidermis</i> FESI-C	9.67 ± 0.58	7.33 ± 0.58	9.00 ± 1.00
<i>Actinomyces viscosus</i>	7.33 ± 0.58	7.33 ± 1.53	5.33 ± 4.62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0	6.00 ± 0.00
<i>Pantoea agglomerans</i>	na	11.00 ± 1.0	6.00 ± 5.29
<i>Salmonella typhi</i>	10.33 ± 0.58	8.67 ± 0.58	8.67 ± 0.58

Halos de inhibición en milímetros (promedio de tres repeticiones) El extracto fue probado a una concentración de 2 mg/sensidisco. na: no activo

De las cepas empleadas para el ensayo se observaron mayores halos de inhibición sobre bacterias Gram positivas representadas en la figura 5, en la que se observan las distintas medias de las tres diferentes resinas sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* ATCC, *Staphylococcus epidermis* FESI-C y *Actinomyces viscosus*

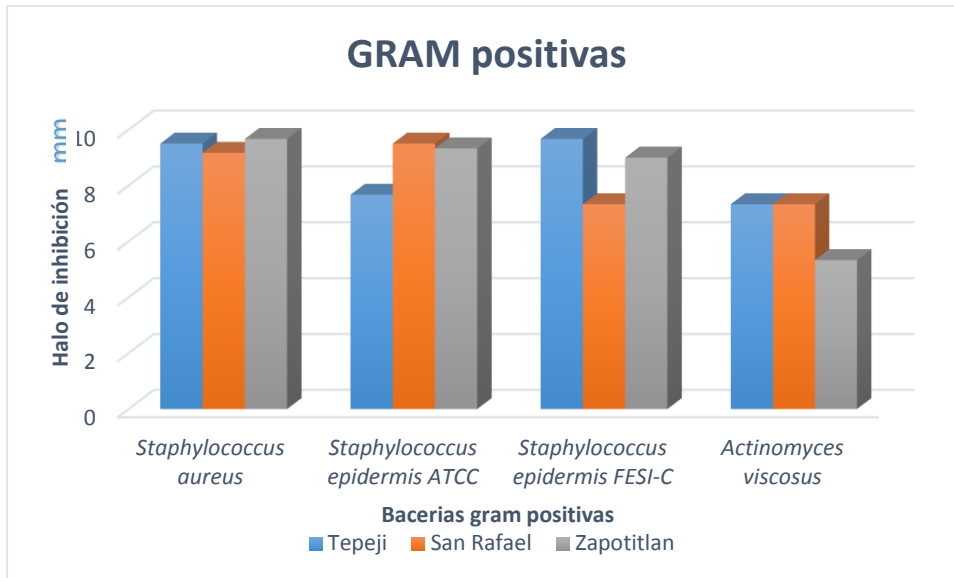


Figura 5. Actividad de las resinas sobre bacterias Gram positivas.

En la figura 6 se muestran las medias que se observaron sobre las bacterias Gram negativas, en las que las resinas tuvieron menores halos de inhibición sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea agglomerans* y *Salmonella typhi*. Las medias varían entre los 6 mm y los 11 mm siendo este el mayor halo de la resina de San Rafael sobre *Pantoea agglomerans*.

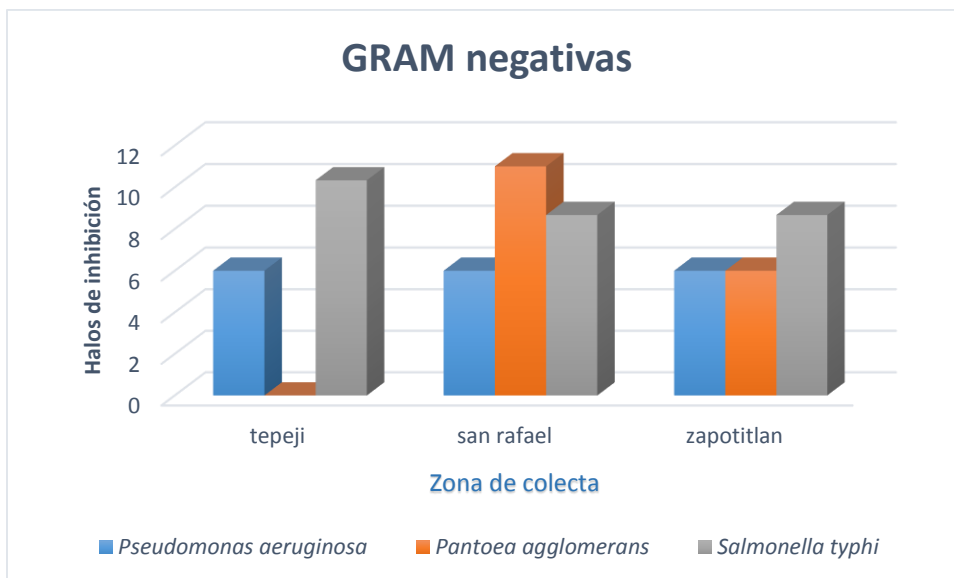
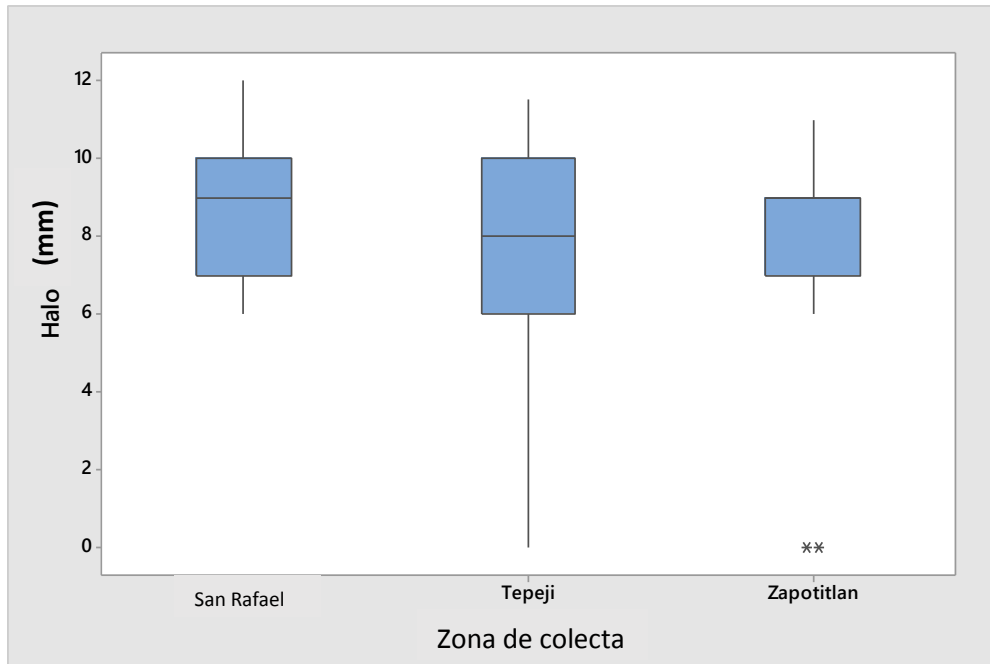


Figura 6. Actividad de las resinas sobre bacterias Gram negativas

Se calcularon las medidas descriptivas para saber si había variación en los datos entre los halos de inhibición entre extractos como se muestra en la figura 7.



\*\* = Datos extremos

Fig 7. Diagrama de cajas de la de variación de halos de las tres diferentes resinas

En la resina de Tepeji se observó una mayor variación de los halos de inhibición con un máximo de 11.5 mm, un mínimo de cero y una mediana de 8.00 mm, la resina de Zapotitlán fue la que tuvo menor variación entre los halos de inhibición con un máximo de 11.00 mm y un mínimo de 6.00 mm con una mediana de 9.00 mm igual al Cuartil 1 este también tiene dos datos extremos. La resina de San Rafael presentó una variación en los halos de inhibición de 12.00 mm como máximo y 6.00 mm como dato mínimo mientras que la mediana es de 9.00 mm.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores en donde se observó que no existen diferencias significativas ( $F = > \alpha 0.5$ )

#### Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

En el cuadro 4. Se observa la actividad antibacteriana de las resinas de *G. glutinosum* siendo las cepas de *S. aureus*, *S. epidermis* ATCC y *S. epidermis* FESI-C las más sensibles presentando valores de CMI y CBM entre 0.75 y 1.25 mg/mL

para las tres resinas y *S. typhi* con valores de CMI y CBM 0.75 y 1.25 mg/mL únicamente con la resina de San Rafael.

Cuadro 4. Concentración mínima inhibitoria y bactericida mínima de las resinas de *G. glutinosum*

Cepas	Tepeji		San rafael		Zapotitlan	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.75	1.25	0.75	1.25	0.375	1.25
<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC	0.75	1.25	1.25	2.5	0.75	1.25
<i>Staphylococcus epidermis</i> FESI- C	0.75	1.25	1.25	2.5	0.75	1.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	20	0.75	1.25	5	20
<i>Pantoea agglomerans</i>	0.75	20	0.375	1.25	1.25	0.375
<i>Actinomyces viscosus</i>	---	---	---	---	---	0.375
<i>Salmonella typhi</i>	---	---	0.75	1.25	---	---

Todas las concentraciones en mg/mL

#### Actividad de los extractos sobre a curva de crecimiento bacteriano

De la actividad de las resinas sobre las curvas de crecimiento bacteriano se determinó si había y a qué hora un descenso drástico de las poblaciones bacterianas.

En la actividad de las resina de Tepeji sobre *Staphylococcus aureus* (Figura 8) se puede observar un descenso drástico del crecimiento bacteriano desde la concentración  $\frac{1}{2}$  CMI (0.375 mg/mL) a partir de la tercer hora, así como en las concentraciones de CMI (0.75mg/mL) y CBM (1.25 mg/mL) se observa un crecimiento mínimo o nulo de las UFC desde la primera hora.

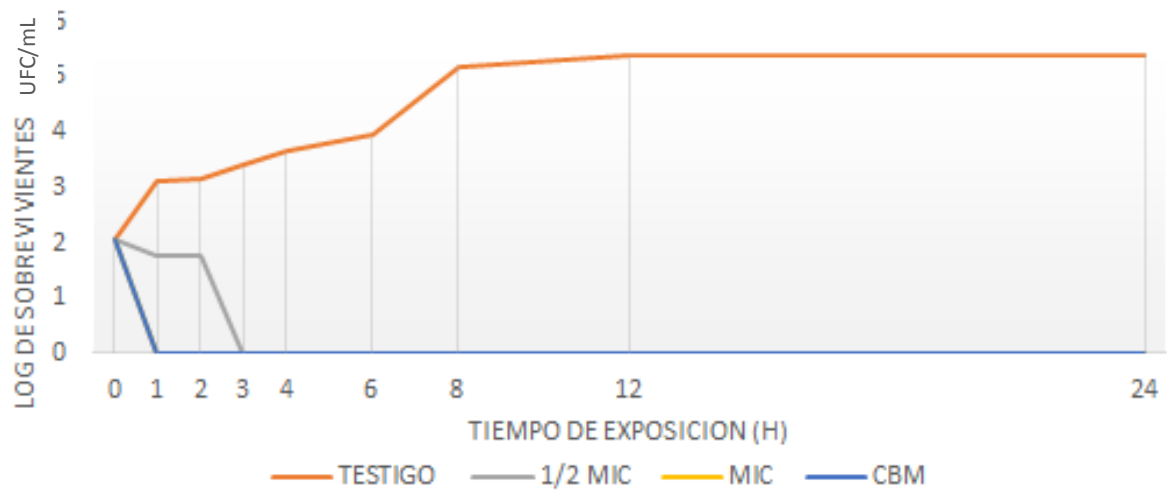


Figura 8. Resina de Tepeji sobre curva de crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*

En cuanto a la resina de San Rafael (Figura 9) se presenta una actividad bacteriostática a la concentración de CBM (1.25 mg/mL) se observa un incremento a la hora 4 y posteriormente decrecen y se mantienen hasta la novena hora por debajo del testigo. En las concentraciones de  $\frac{1}{2}$  CMI (0.375 mg/mL) y CMI (0.75 mg/MI) no presenta gran actividad ya que se comportan de manera semejante al testigo

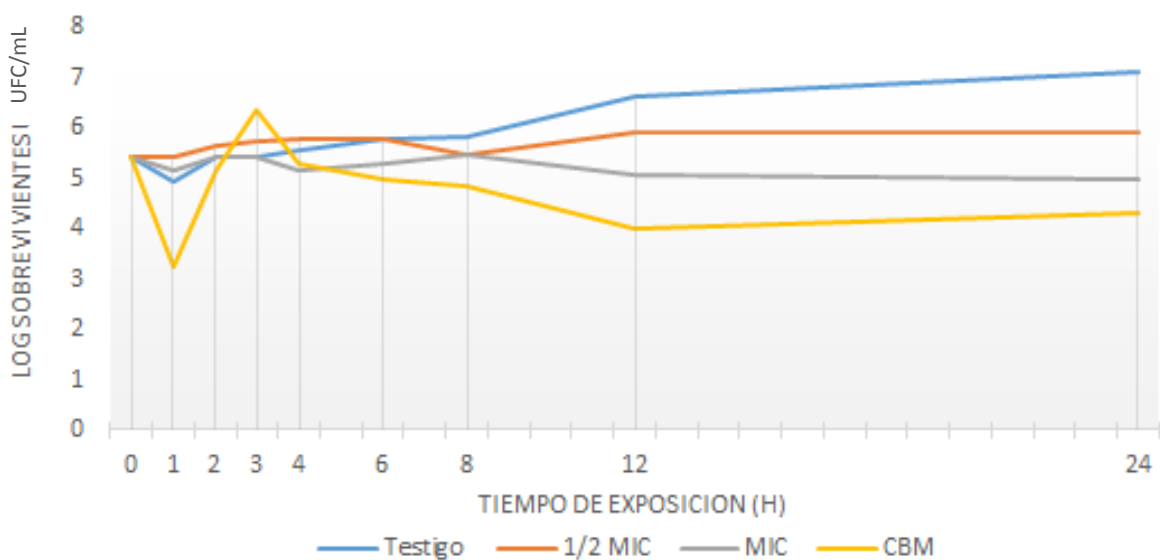


Figura 9. Resina de San Rafael sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*



La resina de Zapotitlán (Figura 10) disminuye el número de UFC al segundo tiempo de medición, posteriormente se ve un incremento en este, la concentración de CBM (1.25 mg/mL) tiene actividad durante las primeras horas disminuyendo el crecimiento de las UFC, posteriormente se observa un incremento en todas las concentraciones por arriba del testigo.

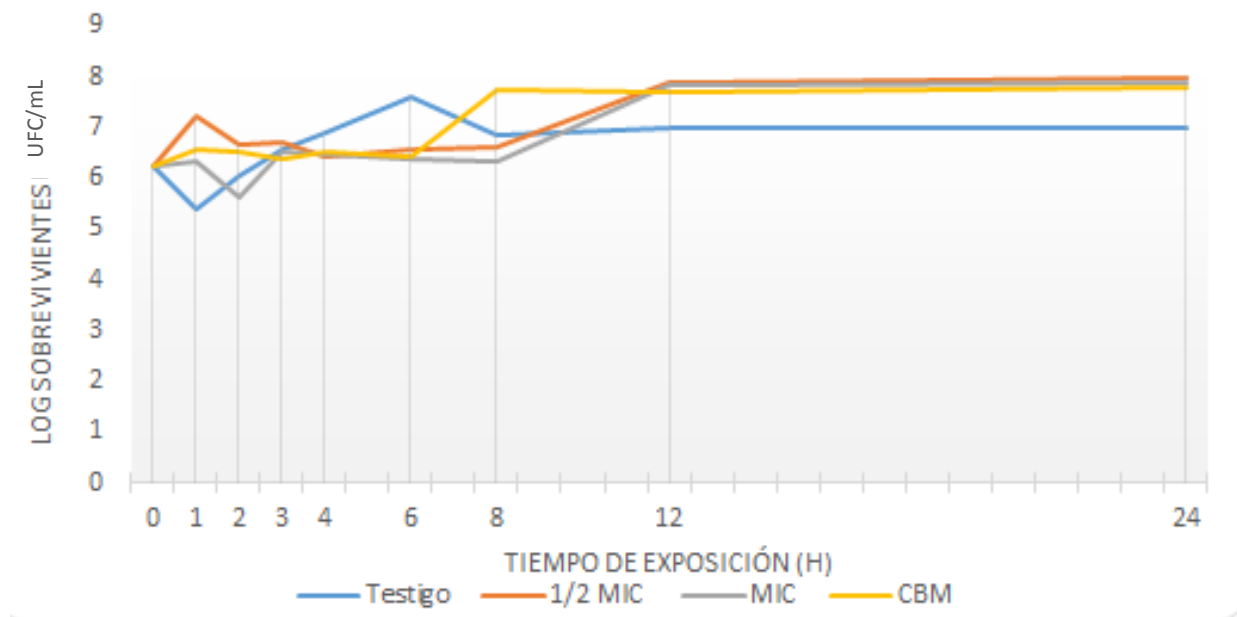


Figura 10. Resina de Zapotitlán sobre curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Sobre *Pantoea agglomerans* la resina de Tepeji (Figura 11) presenta una actividad bacteriostática manteniendo la UFC constantes desde  $\frac{1}{2}$  CMI (0.375) mg/ mL siempre por debajo del testigo, en la concentración CBM (1.25 mg/mL) muestra una disminución de la población bacteriana hasta la octava hora

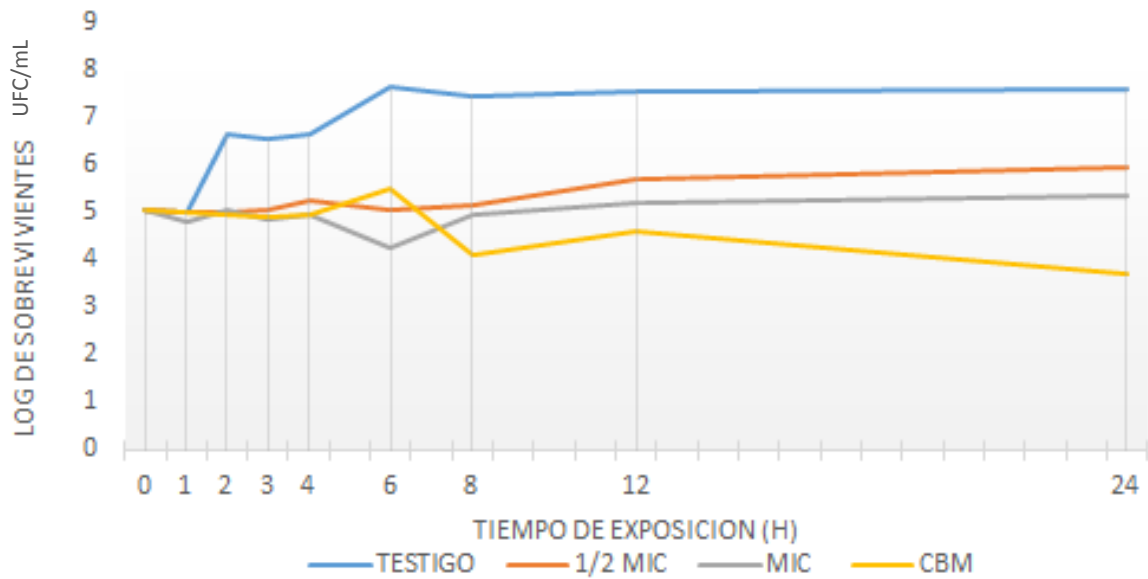


Figura 11. Resina de Tepeji sobre curva de crecimiento bacteriano de *Pantoea agglomerans*

La resina de San Rafael sobre *Pantoea agglomerans* presenta actividad bacteriostática en los primeros tiempos de  $\frac{1}{2}$  CMI (0.187 mg/mL) y CMI (0.75 mg/mL), aunque posteriormente existe un incremento de las UFC para la concentración de CBM se mantienen constantes las UFC y comienzan a decrecer a partir de la hora 12, presentando una actividad bacteriostática.

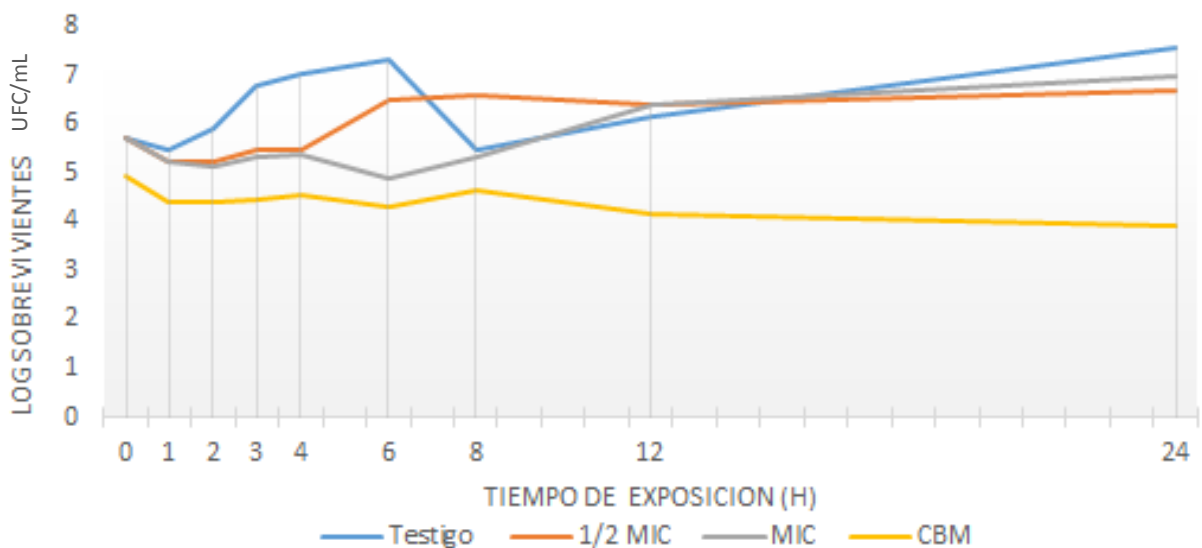


Figura 12. Resina de San Rafael sobre curva de crecimiento bacteriano de *Pantoea agglomerans*

La resina de Zapotitlán no tuvo actividad sobre *Pantoea agglomerans*, las concentraciones de ½ CMI, CMI Y CBM tienen el mismo comportamiento al testigo durante las 24 horas del ensayo.

## EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

### Evaluación cualitativa para levaduras

Las resinas sólo tuvieron actividad sobre *C. albicans* y *C. tropicalis* mostrando los halos de mayor diámetro *C. tropicalis* con una media de 7 mm con las tres resinas, no hubo actividad para *C. neoformans*, *C. albicans* y *C. glabrata* estas dos últimas compradas del cepario de CINVESTAV (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad de las resinas sobre Candidas

Levadura	Tepeji	San Rafael	Zapotitlán
<i>Candida albicans</i>	7.33 ± 0.58	7.0 ± 0	6.0 ± 0
<i>Candida tropicalis</i>	7.00 ± 0.00	7.0 ± 0	7.0 ± 0

Todos los datos en mm

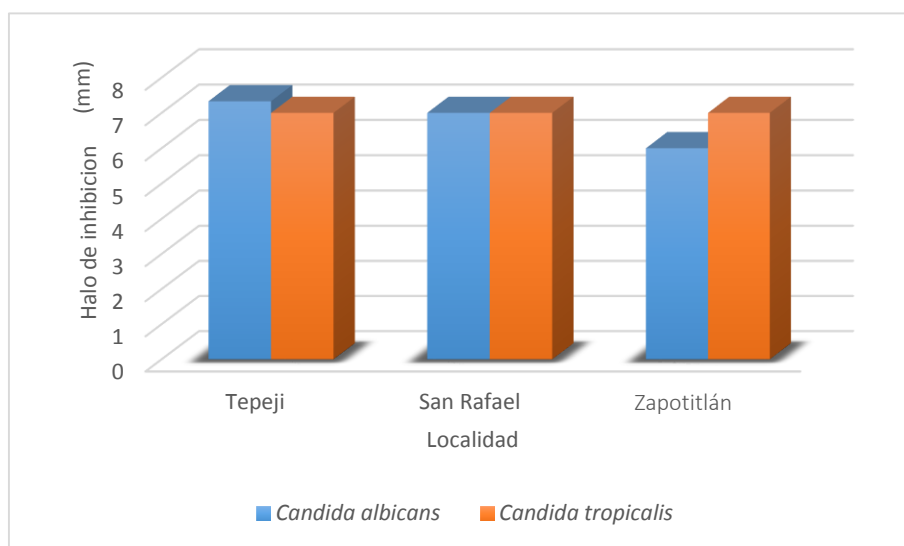


Figura 13. Actividad de las tres resinas sobre *Candida albicans* y *Candida tropicalis*

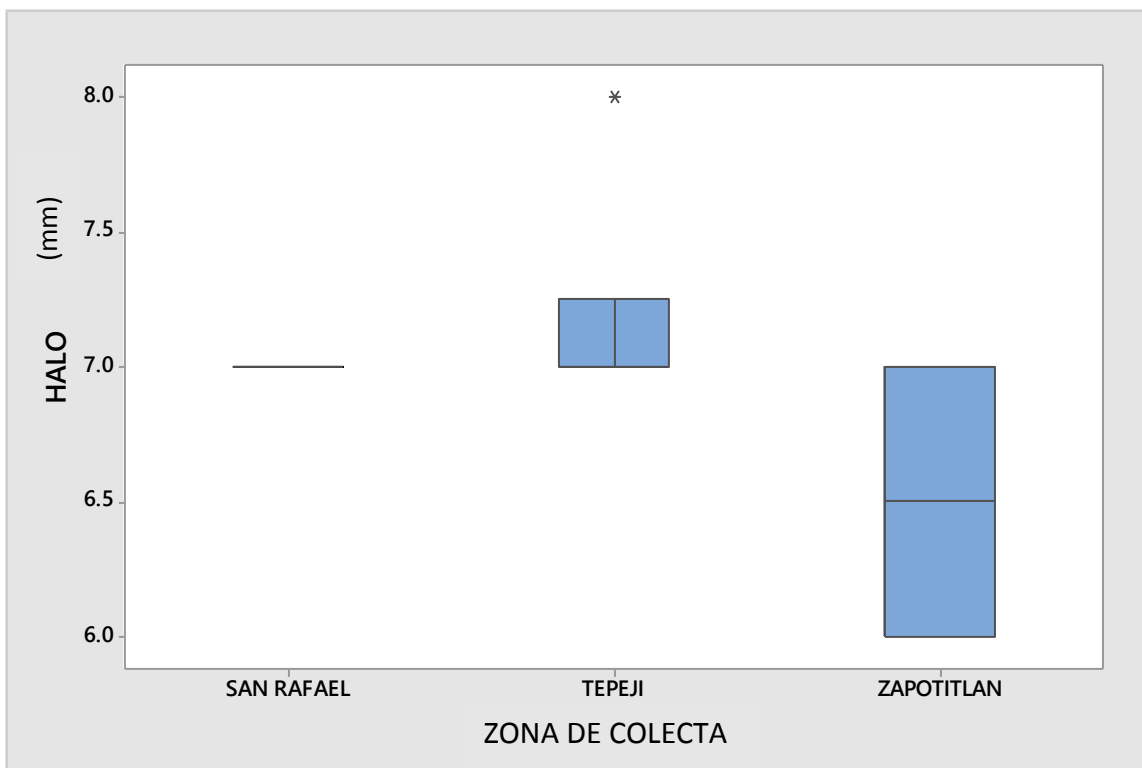


Fig. 14 Diagrama de cajas de la comparación de variación de halos de las tres diferentes resinas sobre cándidas.

En el diagrama de cajas (Figura 14) se puede observar que existe mayor variación en los halos de inhibición que resultaron con la resina de Zapotitlán sobre las levaduras, en donde el Cuartil 1 con 6 mm con una mediana de 6.5 mm y el Cuartil 3 representa 7 mm, la resina de Tepeji muestra menor variación resultando el Cuartil 1 con 7 mm con una mediana de 7 mm y al Cuartil 3 en 7.25 mm, por último la resina de San Rafael no muestra variación en ninguno de los halos con un valor de 7 mm para todas las medidas descriptivas.

En el análisis de varianza se encontró que no existe diferencia significativa entre las zonas de colecta ( $F \Rightarrow \alpha 0.5$ )

#### Evaluación cualitativa de las resinas sobre cepas de hongos filamentosos

Los resultados de la evaluación antifúngica cualitativa demostraron que las tres resinas presentan actividad sobre las mismas cepas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad de las resinas sobre hongos filamentosos.

Hongos	Tepeji	San Rafael	Zapotitlán
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	*	*	*
<i>Fusarium moniliforma</i>	*	*	*
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	*	*	*
<i>Aspergillus sp</i>	*	*	*
<i>Aspergillus niger</i>	*	*	*
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	*	*	*

\*Inhibición del crecimiento radial

#### Evaluación cuantitativa para hongos filamentosos

La concentración de las resinas que inhiben el crecimiento de los hongos se determinó con el ensayo cuantitativo:

En los siguientes cuadros se muestran las  $CF_{50}$  y el porcentaje de inhibición de las resinas sobre el crecimiento de los diferentes hongos filamentosos. En el cuadro 7 se puede observar la actividad de las tres resinas sobre *F. sporotrichioides* en donde los porcentajes de inhibición varían muy poco entre estas, de la misma manera la  $CF_{50}$  que presentan es muy parecida, siendo las menores la de San Rafael y Tepeji con 3.50 mg/mL y la resina de Zapotitlán 3.75 mg/mL.

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición y  $CF_{50}$  de las tres resinas sobre *F. sporotrichioides*.

Concentración mg/ mL	San Rafael %	Zapotitlán%	Tepeji%
0.25	33.33	17.78	26.67
0.5	33.00	28.00	35.56
1	33.00	33.33	42.22
2	34.78	44.44	44.00
4	61.90	46.67	57.78
5	61.00	66.67	58.00
$CF_{50}$	3.50	3.75	3.50

*F. moniliforme* (cuadro 8) resultó muy sensible a las tres resinas presentando desde la más baja concentración (0.25 mg/mL) un porcentaje de inhibición en la resina de San Rafael de 69.23%, en la resina de Zapotitlán 48.89 % y por último y con mayor porcentaje fue la resina de Tepeji con un 86.0 % por esta razón la CF<sub>50</sub> de las tres resinas es menor a los 0.25 mg/mL.

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición y CF<sub>50</sub> de las tres resinas sobre *F. moniliforme*.

Concentración mg/ mL	San Rafael	Zapotitlán	Tepeji
0.25	69.23	48.89	86.00
0.5	58.00	57.78	86.00
1	58.97	70.80	86.34
2	64.10	75.56	88.62
4	82.05	84.44	93.16
5	84.62	86.67	93.16
CF <sub>50</sub>	<b>0.25*</b>	<b>0.25*</b>	<b>0.25*</b>

\*se alcanza una disminución mayor al 50% en la más baja concentración

De la misma forma las resinas presentaron mucha actividad sobre *T. mentagrophytes*, como se muestra en el cuadro 9 obteniendo porcentajes de 93% desde la más baja concentración en las resinas de San Rafael y Tepeji seguidas de 66% en la resina de Zapotitlán. La CF<sub>50</sub> también resulta menor a la más baja concentración que es de 0.25 mg/ mL.

Cuadro 9. Porcentajes de inhibición y CF<sub>50</sub> de las tres resinas sobre *T. mentagrophytes*.

Concentración mg/ mL	San Rafael	Zapotitlán	Tepeji
0.25	93.33	66.67	93.33
0.5	70.00	86.67	93.33
1	75.56	93.33	93.33
2	93.33	93.33	93.33
4	93.33	93.33	93.33
5	93.33	93.33	93.33
CF <sub>50</sub>	<b>0.25*</b>	<b>0.25*</b>	<b>0.25*</b>

\*se alcanza una disminución mayor al 50% en la más baja concentración

Las resinas sobre *Aspergillus* sp. (Cuadro 10), si presentan actividad aunque de manera distinta entre ellas. En la resina de San Rafael los porcentajes de inhibición van desde el 41.46 % desde la primera concentración (0.25 mg/mL) hasta el 68.0%

a los 5 mg/mL y presenta una  $CF_{50}$  de 2.65 mg/mL. Por otro lado la resina de Zapotitlán presenta un porcentaje de inhibición de 10.53% desde la segunda concentración (0.5 mg/mL) y alcanza el 60.53% de inhibición a los 4 mg/mL presentando una  $CF_{50}$  de 5.11 mg/mL. Por último la resina de Tepeji presenta un porcentaje de inhibición de 13.16% a la concentración de 0.25 mg/mL y alcanza el 77.05% a los 4 mg/mL presentando una  $CF_{50}$  de 3.14 mg/mL.

Cuadro 10. Porcentajes de inhibición y  $CF_{50}$  de las tres resinas sobre *Aspergillus* sp.

Concentración mg/ mL	San Rafael	Zapotitlán	Tepeji
0.25	41.46	0.00	13.16
0.5	43.90	10.53	18.42
1	43.90	11.00	26.32
2	43.00	34.21	50.00
4	51.22	60.53	71.05
5	68.29	42.11	68.42
$CF_{50}$	<b>2.65</b>	<b>5.11</b>	<b>3.14</b>

En el cuadro 11 se puede observar la actividad de las resinas sobre *A. niger*, en el que varían los resultados para las tres resinas. La resina de San Rafael presenta porcentajes de inhibición que van desde el 34.88% desde la primera concentración (0.25mg/mL) hasta el 44.19% a los 4 mg/mL con una  $CF_{50}$  de 2.27 mg/mL. La resina de Zapotitlán presenta porcentajes de inhibición de 12.20% a los 0.25 mg/mL y alcanza el 53.66% a los 5 mg/mL con una  $CF_{50}$  de 5.14 mg/mL. Por último la resina de Tepeji presenta un porcentaje de inhibición del 25% desde la más baja concentración y alcanza un 59% a los 5 mg/mL y obtuvo una  $CF_{50}$  de 4.36 mg/mL.

Cuadro 11. Porcentajes de inhibición y CF<sub>50</sub> de las tres resinas sobre *Aspergillus niger*

Concentración mg/ mL	San Rafael	Zapotitlán	Tepeji
0.25	34.88	12.20	25.00
0.5	34.00	18.00	25.00
1	34.00	21.95	29.55
2	44.19	31.71	34.09
4	44.19	43.90	50.00
5	34.88	53.66	59.09
CF <sub>50</sub>	<b>2.27</b>	<b>5.14</b>	<b>4.36</b>

La actividad sobre *R. lilacina* es muy evidente, presentando porcentajes de inhibición mayores al 50% desde la primera concentración en los tres casos, la resina de San Rafael obtuvo el mayor porcentaje con un 75.68% seguida de la resina de Tepeji con un 68.89% y por último la resina de Zapotitlán con un 52.50% en los tres casos se obtuvo una CF<sub>50</sub> menor a los 0.25 mg/mL.

Cuadro 12. Porcentajes de inhibición y CF<sub>50</sub> de las tres resinas sobre *R. lilacina*

Concentración mg/ mL	San Rafael	Zapotitlán	Tepeji
0.25	75.68	52.50	68.89
0.5	50.00	60.00	75.56
1	56.76	80.00	82.22
2	75.68	87.50	86.67
4	81.08	82.50	88.89
5	83.78	92.50	93.33
CF <sub>50</sub>	0.25*	0.25*	0.25*

\*se alcanza una disminución mayor al 50% en la más baja concentración

## TOXICIDAD GENERAL

El resultado sobre la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de las resinas sobre larvas nauplio de *Artemia salina* se muestra en el cuadro 13 y en la figura 15. En el que se observa que las tres resinas presentan una toxicidad fuerte de acuerdo al criterio de McLaughlin en 1991.



Cuadro 13. Concentración letal media de las resinas sobre larvas nauplio de *Artemia salina*

Localidad	CL <sub>50</sub> µg/mL
Zapotitlán	75.93
San Rafael	70.62
Tepeji	67.51

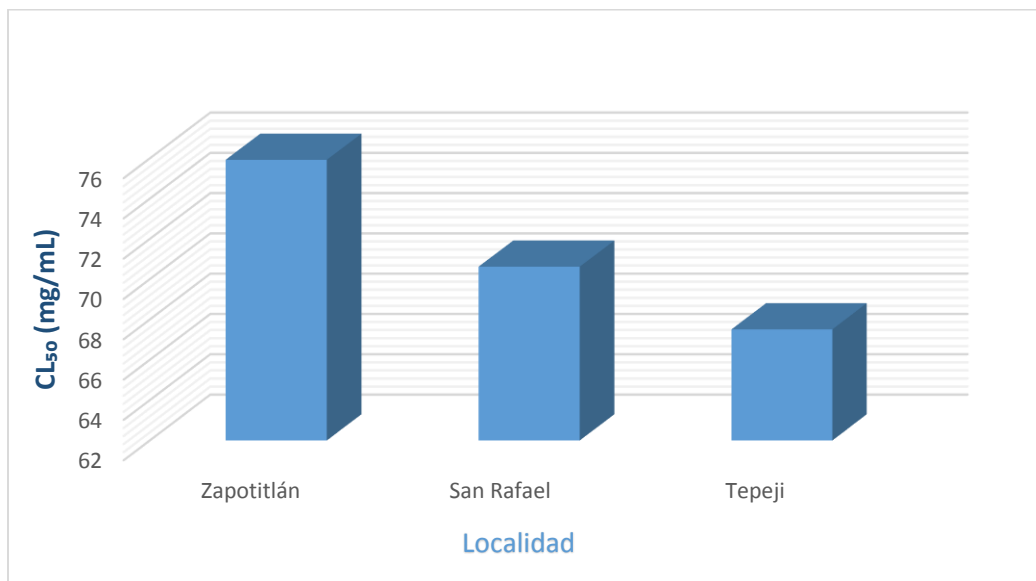


Figura 15. Concentración letal media de las tres resinas sobre larvas nauplio II de *Artemia salina*

## CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Una reacción de defensa es la generación de radicales libres, los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos pero también pueden afectar a las células, por esto resulta importante medir la capacidad antioxidante de cada resina.

Se encontró que la CA<sub>50</sub> de la resina de Zapotitlán fue la menor con 71 ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) seguida de la resina de San Rafael con 47.46 ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 28.79 ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la resina de Tepeji como se muestra en el cuadro 14.

Cuadro 14. Capacidad antioxidante de las resinas

Resina	CA <sub>50</sub> (ppm)
Zapotitlán	71
San Rafael	47.46
Tepeji	28.79

## MARCHA FITOQUIMICA

### Determinación de fenoles totales

Se determinó la concentración de fenoles totales de las 3 resinas para comprobar la actividad antioxidante ya que muchas veces las sustancias mayormente asociadas a ésta son los fenoles. Se obtuvo que la resina de San Rafael presentó mayor contenido de fenoles con 45.18 mg eAG/g extracto seguida de la resina de Tepeji con 8.112 mg eAG/g extracto y por último la resina de Zapotitlán con un contenido de 5.48 mg eAG/g extracto (Cuadro 15).

Cuadro 15. Determinación de fenoles totales

Localidad	mg eAG/g
San Rafael	45.18
Tepeji	8.112
Zapotitlán	5.48

## Determinación de flavonoides totales

Se realizó la determinación de flavonoides totales ya que también presentan actividad antioxidante.

En el caso del contenido de flavonoides totales se obtuvieron valores similares para las tres resinas siendo la de mayor contenido la resina de Tepeji con 3.512 mg eQ/g extracto seguida de la de San Rafael con un contenido de 2.427 mg eQ/gr extracto y por último la resina de Zapotitlán con 2.224 mg eQ/gr extracto (Cuadro 16).

Cuadro 16. Determinación de flavonoides totales

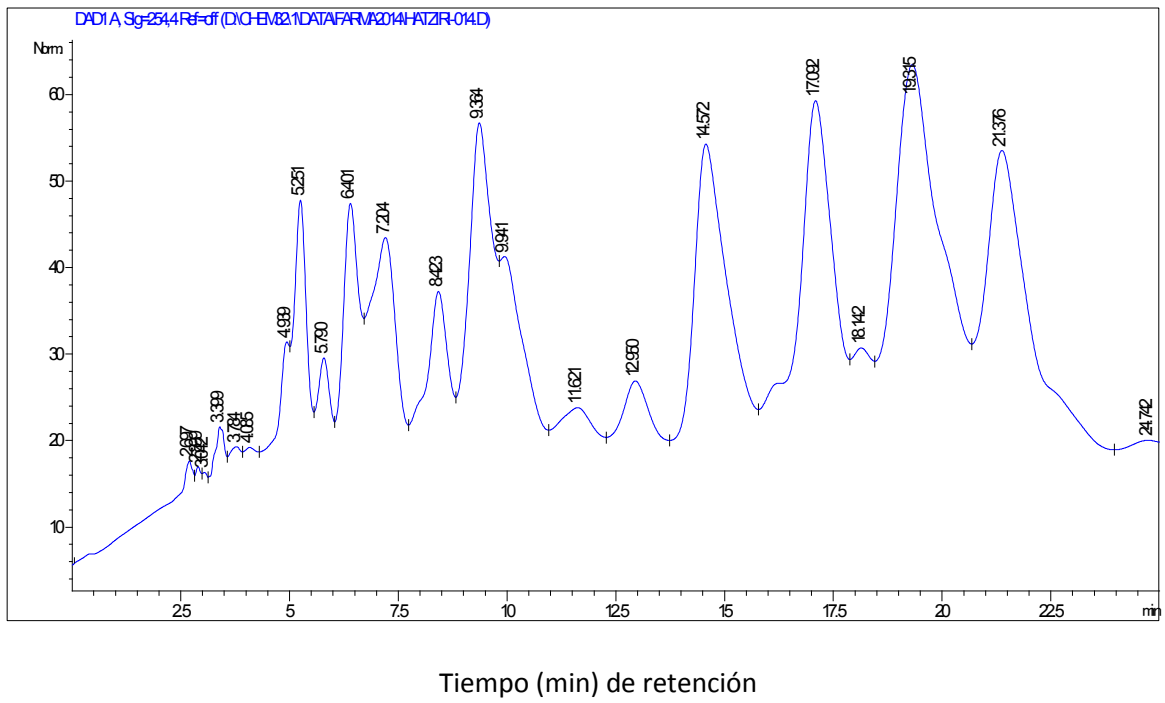
Localidad	mg eQ/g
Tepeji	3.512
San Rafael	2.427
Zapotitlán	2.224

## Cromatografía líquida de alta resolución

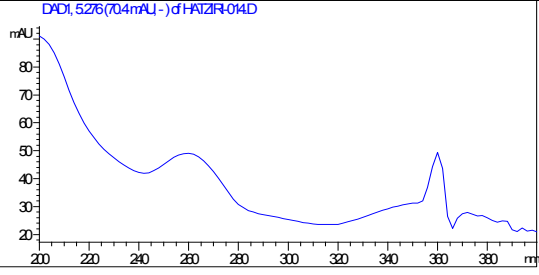
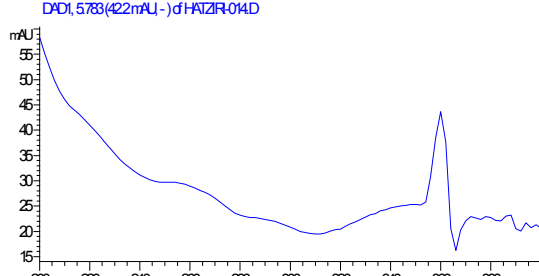
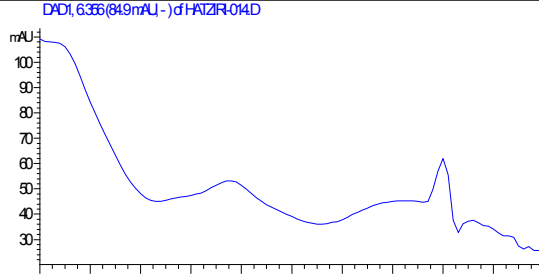
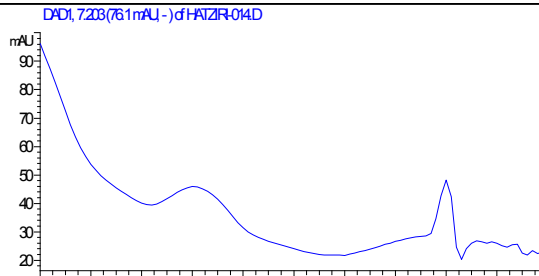
Una vez realizados los ensayos biológicos las resinas fueron analizadas en una HPLC para observar el contenido polar de las resinas y conocer los compuestos responsables de la actividad sobre los organismos ya antes mencionados.

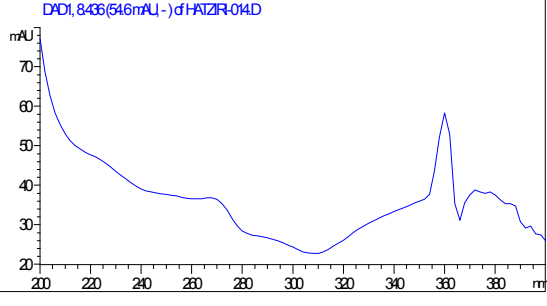
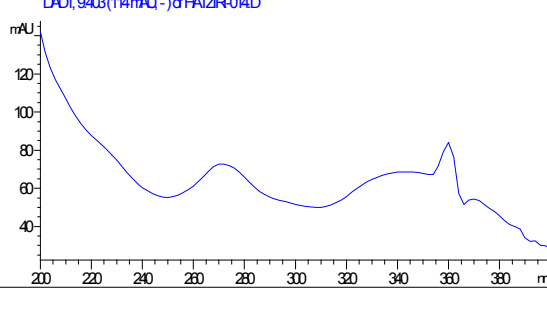
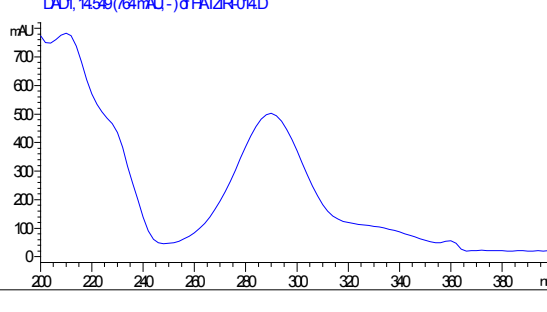
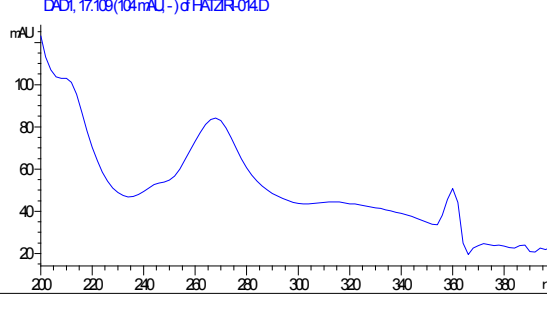
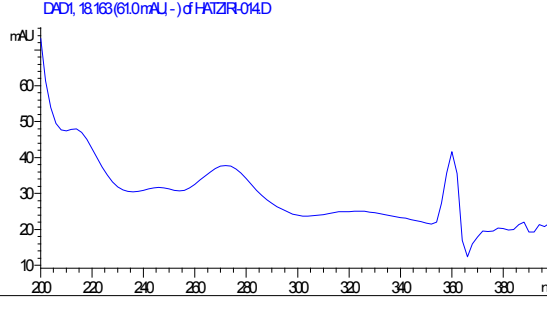
A continuación se muestra muestran los picos de absorción y tiempos de retención de la resina de Tepeji (Fig. 16 y Cuadro 17).

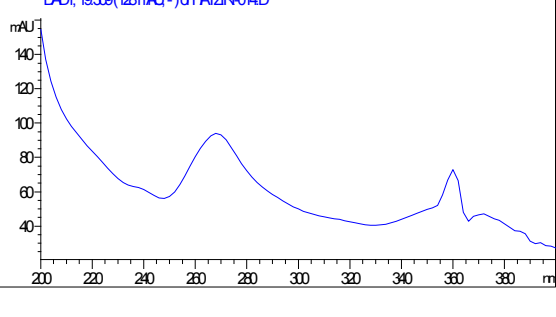
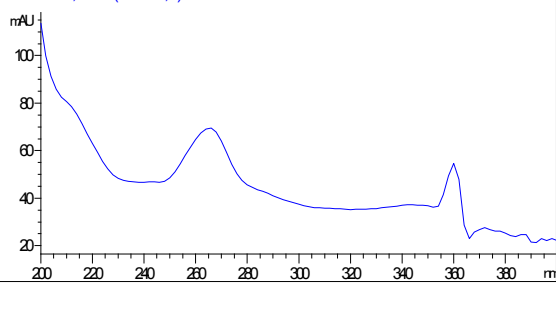
Figura 16. Cromatograma de HPLC de la resina de Tepeji



Cuadro17. Tiempo de retención y UV máxima de la resina de Tepeji.

Espectro	Tiempo de retención (min)	UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	% de concentración relativa
 <p>DAD, 5.276(704mAU-)d\FRIZR-014D</p>	5.276	260	Fenol	2.868
 <p>DAD, 5.783(422mAU-)d\FRIZR-014D</p>	5.783	260	Fenol	1.664
 <p>DAD, 6.366(849mAU-)d\FRIZR-014D</p>	5.783	274	Fenol	1.664
 <p>DAD, 7.203(761mAU-)d\FRIZR-014D</p>	7.203	262	Fenol	5.125

	8.436	270	Fenol	4.250
	9.403	272	Fenol	6.356
	14.549	290	Pinocembrina	10.094
	17.109	268	Fenol	11.292
	18.163	244 272	Derivado del ácido benzoico	2.382

	19.369	268	Fenol	14.918
	21.389	266	Fenol	14.469

En la siguiente figura se muestran los picos de absorción y tiempos de retención de la resina de Zapotitlán. (Figura 17, cuadro 18)

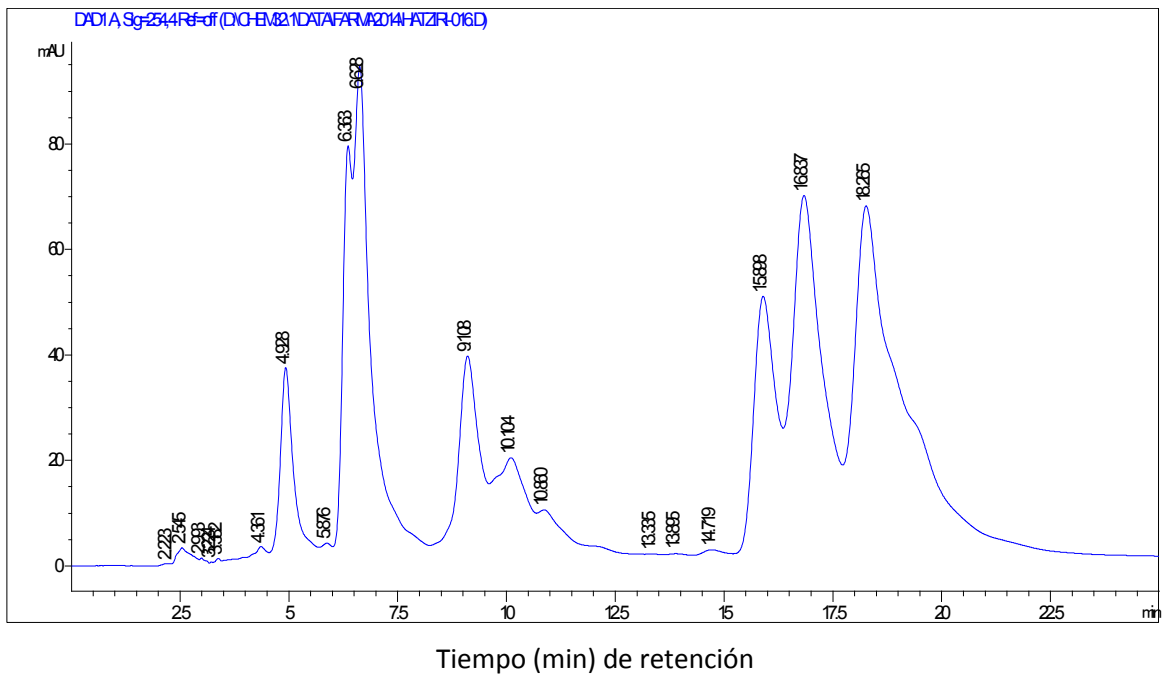
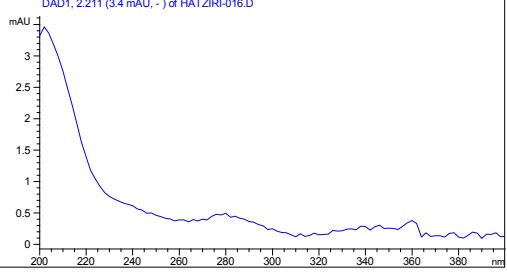
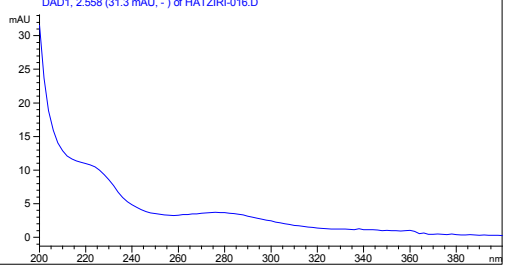
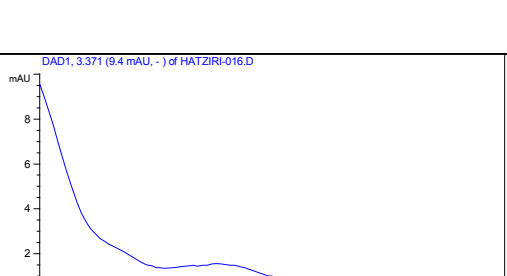
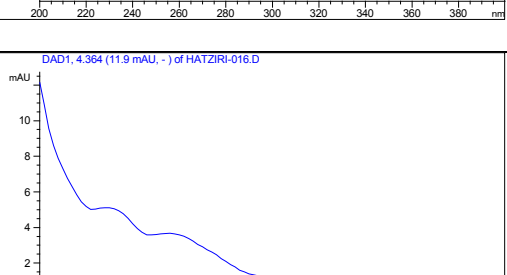


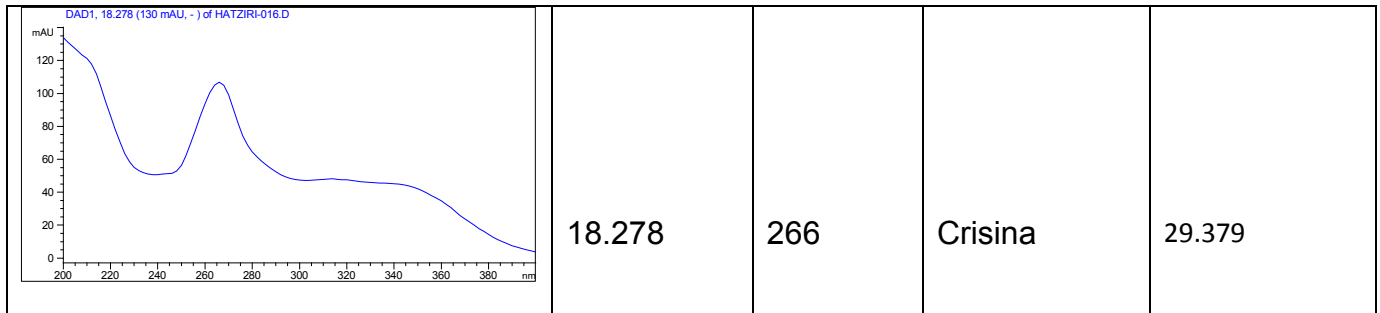
Figura 17. Cromatograma de HPLC de la resina de Zapotitlán

Cuadro 18. Tiempo de retención y UV máxima de la resina de Zapotitlán

Espectro	Tiempo de retención (min)	UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	% de concentración relativa
 <p>DAD1, 2.211 (3.4 mAU, -) of HATZIRI-016.D</p>	2.211	280	Fenol	0.438
 <p>DAD1, 2.558 (31.3 mAU, -) of HATZIRI-016.D</p>	2.558	240 280	Derivado del ácido benzoico	0.065
 <p>DAD1, 3.371 (9.4 mAU, -) of HATZIRI-016.D</p>	3.371	278	Fenol	0.062
 <p>DAD1, 4.364 (11.9 mAU, -) of HATZIRI-016.D</p>	4.364	230 256	Derivado del ácido benzoico	0.545



	5.871	292	Pinocembrina	0.330
	6.358	276 336	Flavonoide	6.269
	10.851	274 338	Flavonoide	2.367
	15.884	272	Fenol	9.493
	16.851	276	fenol	18.325



En la siguiente figura se muestran los resultados se muestran los picos de absorción y tiempos de retención de la resina de San Rafael (Figura 18, cuadro 19)

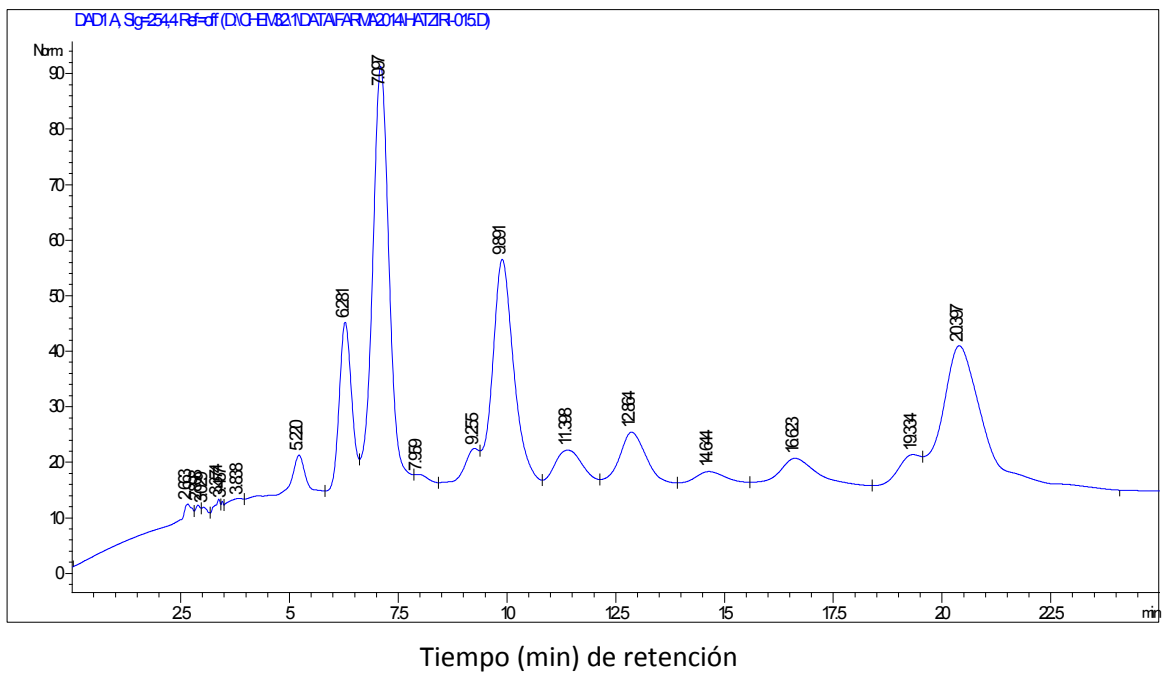
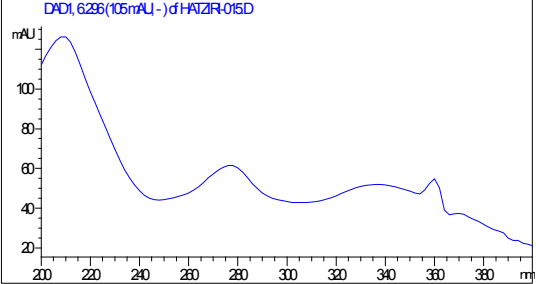
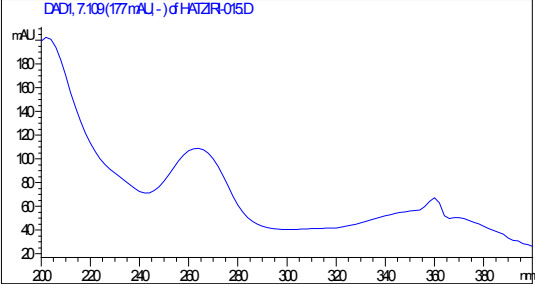
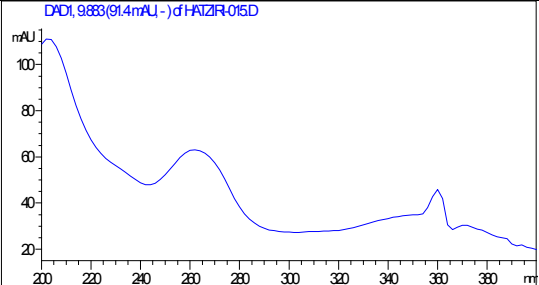
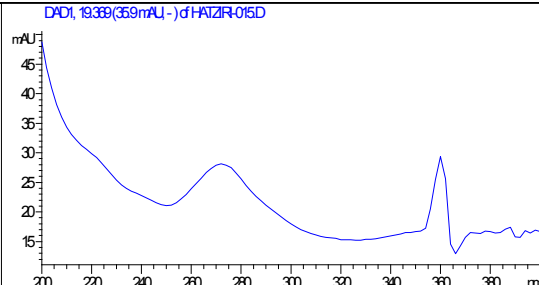
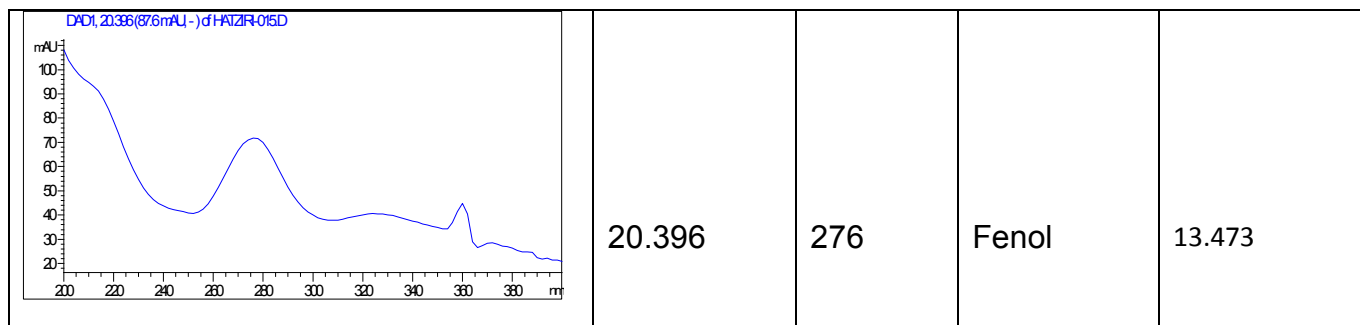


Figura 18. Cromatograma de la resina de San Rafael.

Cuadro 19. Tiempo de retención y UV máxima de la resina de San Rafael

Espectro	Tiempo de retención mínima	UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	% de concentración relativa
	6.296	278, 336	Flavonoide	6.586
	7.109	264	Fenol	16.691
	9.883	262	Fenol	13.088
	19.369	272	Fenol	2.885



## DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado un aumento de las enfermedades producidas por hongos y bacterias, que se han vuelto resistentes a los antibióticos convencionales empleados para combatirlos, es por ésto que se ha optado por buscar antimicrobianos de origen natural. En las plantas se han encontrado moléculas con actividad antimicrobiana como los metabolitos secundarios que son utilizados como mecanismos de defensa contra patógenos, propiedad mencionada por Cowan (1999) y Lambers y colaboradores (1998), lo que explica la propiedad antibiótica de los extractos de plantas, entre ellas *G. glutinosum* la que cuenta sólo con estudios sobre extractos metanólicos, hexánicos y únicamente un ensayo sobre la resina con actividad amebicida (Peña, 2009), por lo que este estudio es el primero en realizar la comparación de la actividad antibacteriana y la variación de la composición química de las resinas de tres localidades.

Respecto a la planta que obtuvo el mayor rendimiento fue la de San Rafael con 16.0%, a diferencia de la resina de Tepeji que presentó el menor con sólo 3.7% y entre ellas resultó la de Zapotitlán con 4.99% de rendimiento (Fig. 4). Esto puede deberse a la cantidad de compuestos que contienen las resinas dependiendo de qué tan estresadas o no se encontraban en las zonas en la que fueron colectadas ya que como lo menciona Sepúlveda-Jiménez (2003). Las plantas sintetizan metabolitos secundarios en respuesta o defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico como la intensidad de luz, estrés hídrico, suministro de nutrientes, altas temperaturas. Briskin (2007) menciona que algunos compuestos como el nitrógeno, el fósforo, el calcio, el magnesio y algunos micronutrientes también son factores de estrés que intervienen en la ruta metabólica de estos compuestos. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Serrano en 2004, donde el extracto metanólico de San Rafael resultó con mayor rendimiento atribuyendo este resultado a menor precipitación y mayor temperatura que en la zona de Tepeji, esto también explica el rendimiento en la zona de Zapotitlán ya que resulta un poco más seca que la localidad de Tepeji.

Dado que todas las bacterias que se utilizaron en este estudio son de importancia médica y se sabe que algunas presentan sensibilidad a algunos antibióticos como se muestra en un antibiograma (apéndice 12) es de gran relevancia conocer que las resinas de *G. glutinosum* sí tienen actividad sobre estas bacterias, esto se corrobora con los ensayos cualitativos y cuantitativos.

En el ensayo cualitativo sobre bacterias, la actividad se observó sobre 6 cepas para Tepeji, 7 para San Rafael y 7 para Zapotitlán (Cuadro 3), de las cuales tres (*A. viscosus*, *P. aeruginosa*, *P. agglomerans*) son por primera vez reportadas con sensibilidad a las resinas de esta especie. En el estudio reportado por Serrano (2004) se realiza una comparación del extracto hexánico y metanólico de las localidades de Tepeji y San Rafael en el que se encuentra actividad en mayor número de cepas (11 y 9 respectivamente), las cepas sensibles (*S. lutea*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. boydii*, *V. cholerae* No. 01, *V. cholerae* Tor, *S. typhi*, *V. cholerae* agua, *E. aerogenes*, *V. cholerae* cc). El extracto hexánico de San Rafael no actuó contra *B. subtilis* y *V. cholerae* Tor.). La acción antimicrobiana que presentan las resinas puede intervenir en la expansión de la membrana, el incremento de la fluidez y la permeabilidad de la misma, la perturbación de las proteínas embebidas en la membrana, la inhibición de la respiración y la alteración del proceso de transporte de iones en las bacterias Gram positivas y Gram negativas como lo menciona (Carson et al., 2002; Brehm y Johnson, 2003) de la misma manera se le atribuye esta propiedad gracias a la presencia de fenoles y ácidos fenólicos que pueden ocasionar una perturbación en la producción de energía ocasionando la inhibición enzimática por medio de productos oxidados como lo menciona Mason y Wasserman en 1987, también se ha reportado que algunos flavonoides pueden actuar a nivel de la síntesis de ácidos nucleicos (Mori et al., 1987; Cushnie y Lamb, 2005)

Además de lo anterior, fue posible observar una mayor tendencia por inhibir bacterias Gram positivas (Fig. 5) por parte de las tres resinas, reduciendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ATCC, *Staphylococcus epidermidis* FESI-C y *Actinomyces viscosus*. Esto puede deberse a que las bacterias Gram positivas estructuralmente presentan un peptidoglucano que se encuentra dentro de una matriz compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicos; lo cual le confiere a la pared celular una carga negativa neta, necesaria para que la célula asimile cationes divalentes; esta característica la hace más sensible a los compuestos polares a diferencia de las bacterias Gram negativas en las que la membrana es más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga et al., 2002; Gros et al., 1985).

El ensayo cualitativo fue corroborado con la determinación de CMI y CBM. De las resinas, se obtuvieron resultados distintos en cuanto a las concentraciones inhibitorias así como también a las bacterias sensibles (Cuadro 4). La resina de Tepeji presentó menor concentración en CMI con valores de 0.75 mg/mL para tres cepas (*S. aureus*, *S. epidermis* ATCC y *S. epidermis* FESI-C) y resultó sin actividad para *A. viscosus* y *S. typhi*. La muestra de San Rafael presentó una CMI de 0.75 mg/mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhi* así como un valor de 0.375 mg/mL para *P. agglomerans* y no presentó actividad sobre *A. viscosus*. La resina de Zapotitlán presentó mayor actividad sobre *A. viscosus* con un valor de 0.375 mg/mL en la CBM, a diferencia de lo reportado por Serrano (2004) en el que menciona que la fracción polar del extracto hexánico de Tepeji presenta valores menores a la fracción de San Rafael, esto dista de lo encontrado en este ensayo, ya que las tres resinas presentan concentraciones variadas sobre las bacterias analizadas esto puede deberse a que los compuestos responsables de inhibir el crecimiento de las bacterias se encuentran en concentraciones parecidas en las tres resinas.

Según el efecto de su acción sobre las bacterias, los antibióticos se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, y depende de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisar la bacteria, inhibir una ruta metabólica o actuar sobre una enzima. (Cué y Morejón, 1998). También para que sea un buen antibiótico debe actuar a cierta concentración y durante un determinado tiempo, para asegurar la muerte o limitar el crecimiento de las bacterias, y esto no sólo es proporcional al número de células presentes sino también al número de factores que van a estar atacando, es decir a la concentración de agente químico o la intensidad del agente físico (Pelczar y Chan, 1984).

Para conocer si las resinas tienen actividad bacteriostática o bactericida y en que momento empiezan a actuar se realizó la prueba de curva de crecimiento bacteriano. La resina de Tepeji tiene actividad bactericida sobre *S. aureus* (Fig. 8) que es un patógeno que causa infecciones de diversa gravedad en niños y adultos además de presentar una frecuencia alta, se estima en 28.4 casos por cada 100.000 personas de todas las edades (Luapland, 2003) desde la concentración  $\frac{1}{2}$  CMI a (0.375 mg/mL) a partir de la tercer hora y un crecimiento casi nulo en las concentraciones más altas, además de representar 5 zonas de impacto en las que se puede estar afectando la reproducción o crecimiento de las bacterias por la muerte exponencial que se observó a lo largo del experimento según Pelczar y Chan (1984). La resina de San Rafael (Fig. 9) que tiene una actividad bacteriostática y mantiene las UFC en todas las concentraciones por debajo del testigo. La resina de Zapotitlán solo disminuye el crecimiento bacteriano durante las primeras dos horas, después las UFC se comportan igual al testigo (Fig 10), lo que podría deberse a que la resina de Tepeji presenta algún compuesto que está afectado directamente

alguna función esencial de *S. aureus*, por otra parte las concentraciones empleadas de las resinas de San Rafael y Zapotitlán podrían ser menores a las necesarias para tener mayor actividad sobre esta bacteria o tal vez se requiere más de una dosis .

Sobre *Pantoea agglomerans* que es una enterobacteria aislada frecuentemente en plantas, frutas y vegetales, pero que también se ha encontrado en heces humanas y de animales. Como patógeno se ha descrito clásicamente como causante de infecciones localizadas como sinovitis y artritis (Segado-Arenas et al., 2012). La resina de Tepeji presenta una actividad bacteriostática manteniendo las UFC constantes desde  $\frac{1}{2}$  CMI (0.375 mg/ mL) siempre por debajo del testigo ( Fig 11). La resina de San Rafael (Fig. 12) también presenta actividad bacteriostática en los primeros tiempos de  $\frac{1}{2}$  CMI (0.187 mg/mL) y CMI (0.75 mg/mL), aunque posteriormente existe un incremento de las UFC para la concentración de CBM se mantienen constantes por debajo del testigo. La resina de Zapotitlán no tuvo actividad sobre *P. agglomerans*, las concentraciones de  $\frac{1}{2}$  CMI, CMI y CBM tienen el mismo comportamiento al testigo durante las 24 horas del ensayo, el comportamiento de las resinas de Tepeji y San Rafael sobre *P. agglomerans* puede deberse a que las concentraciones empleadas no fueron las necesarias para actuar más tiempo sobre la bacteria. Esta es la primera vez que se registran estos resultados sobre la actividad de las resinas de *Gymnosperma glutinosum* .

Sobre las pruebas antifúngicas, se encuentra actividad sobre dos candidas, *C. albicans* y *C. tropicalis* (Fig. 13), a diferencia de lo reportado por Serrano 2006 en donde el extracto hexánico de la planta de Zapotitlán no presenta actividad sobre éstas, la actividad puede ser atribuida a la acción de sesquiterpenos especialmente el bisabolol y flavononas como la pinocembrina, presentes en las resinas, que son compuestos con actividad antifúngica según Gonzalez 2007 y Martins et al., 2002; Del mismo modo se encontró actividad sobre seis hongos filamentosos (*F. sporotrichioides*, *F. moniliforme*, *T. mentagrophytes*, *Aspergillus sp*, *A. niger*, *R. lilacina*), resultados parecidos a lo reportado por Serrano (2006) en el que menciona que el extracto hexánico provocan inhibición del crecimiento radial sobre cinco especies de hongos filamentosos (*A. niger*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichum*, *R. solani*, *T. mentagrophytes*)

En la prueba cuantitativa las resinas mostraron una inhibición del crecimiento radial importante sobre *F. moniliforme* CDBB-H-265, *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112 y *R. lilacina* CDBB-H-306 ya que se alcanza una inhibición del crecimiento de más del 50% desde las más bajas concentraciones (cuadro 7). Las tres resinas muestran una actividad relevante sobre todos los hongos estudiados, esto puede deberse a

la presencia de flavonoides en los extractos además de un diterpeno con esqueleto tipo ent-labdano (8,13,14,15-tetrahidroxilabdano) y dos flavonas metoxiladas (la 5,7-dihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona y la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona) con actividad antifúngica encontrados y reportados por Serrano (2006) y Yu et al., (1988) que pudieran estar presentes en las resinas, también los flavonoides de naturaleza lipofílica como las flavanonas presentan actividad fungicida según Cartaya y Reinaldo (2001), una de estas flavanonas fue aislada de la resina de *G. glutinosum* reportada por Mendoza (2012) llamada Eriodictiol que además presenta actividad amebicida y la pinocembrina reportada en este ensayo siendo la resina de Tepeji la que presentó mayor actividad.

Sobre la marcha fitoquímica los compuestos encontrados en HPLC son muy parecidos entre las tres resinas, se pueden observar fenoles pues la longitud de onda a la que presenta la mayor absorción de luz UV es de 230 y 290 nm usualmente con un hombro (Olsen, 2003) (Fig. 16-18, Cuadro 17- 19). A los fenoles y polifenoles se les ha atribuido actividad antimicrobiana antioxidante antiviral y antifúngica (Cowan, 1999) ésto se comprueba con la prueba de concentración de fenoles totales de las 3 resinas en la que se obtuvo que la resina de San Rafael presentó mayor contenido de estos con 45.18 mgeAG/g extracto seguida de la resina de Tepeji con 8. 112 mgeAG/g extracto y por último la resina de Zapotitlán con un contenido de 5.48 mgeAG/g extracto (Cuadro 15). Por la misma prueba HPLC se encontraron flavonoides que son pigmentos naturales presentes en los vegetales, estos contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez-Flórez, 2002). Dentro de este grupo se encontró Pinocembrina que es una flavanona con actividad antiparasitaria, en particular antimalárica, antigárdica y antileishmánica (Keterene et al., 2012; Rufino-González et al., 2012) también se ha reportado actividad contra *Candida albicans* *Tricophyton rubrum* y *Tricophyton mentagrophytes* (Ruddock et al., 2011 y Lago et al., 2012).

En cuanto a la actividad antioxidante, se sabe que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides así como el ácido ascórbico como lo reporta Soto (2007). Éstos protegen a lípidos y otros compuestos celulares del ataque de agentes oxidantes como los radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos (Drago et al., 2006). Lo anterior es de suma importancia ya que las células están expuestas a especies reactivas de oxígeno y son capaces de tolerar estados



de estrés oxidativo leve, sin embargo, situaciones extremas de estrés oxidativo pueden afectar el metabolismo celular (Soledad 2007). La resina de Zapotitlán fue la que presentó menor actividad con 71  $\mu\text{g/mL}$  seguida de la de San Rafael (47.46  $\mu\text{g/mL}$ ) y la de mayor fue la de Tepeji (28.79  $\mu\text{g/mL}$ ), esto coinciden con la concentración de fenoles y flavonoides (Cuadro 14). Por lo tanto la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides corroboran la actividad antioxidante de estas resinas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad general las resinas resultaron con un índice de toxicidad fuerte según el criterio de McLaughlin et al., 1998, con una  $CL_{50}$  para la resina de Zapotitlán de 75.93  $\mu\text{g/mL}$  seguido de la resina de San Rafael con 70.62  $\mu\text{g/mL}$  y por último la resina de Tepeji con 67.51  $\mu\text{g/mL}$  a diferencia de lo reportado por Peña (2009) en donde menciona que la resina presenta un valores de toxicidad de moderada a baja (444  $\mu\text{g/mL}$ ) esto puede ser por que se desarrolla en un lugar diferente y las condiciones de estrés biótico y abiótico en la que se colectó esta planta. Por otra parte la toxicidad alta de las tres resinas estudiadas en este ensayo, puede deberse a que éstas se encuentran concentradas, y de esta manera es como puede tener mayor actividad sobre todos los microorganismos con los que se realizaron pruebas, las personas consumen la planta de modo de infusión, lo que diluye y se consume a concentraciones mucho menores por lo que no es nociva para la salud de los consumidores.

La suma de las propiedades antibacterianas y antifúngicas, además de la capacidad antioxidante de las resinas corrobora el uso medicinal y farmacológico que se la ha dado por años

## **CONCLUSIONES**

**Las resinas son probadas por primera vez con actividad antimicrobiana y las conclusiones a las que se llegó son:**

- **Las resinas presentan actividad antibacteriana y antifúngica.**
- **La resina de Tepeji presenta actividad bactericida, las resinas de San Rafael y Zapotitlán presentan actividad bacteriostática.**
- **Las tres resinas presentan toxicidad alta.**
- **Las tres resinas presentan actividad antioxidante.**
- **La composición química y propiedades medicinales dependen de la zona geográfica donde se desarrolla *G. glutinosum*.**

# APÉNDICES

## APÉNDICE 1

La familia Asteraceae, es una familia de Angiospermas, plantas con flores, que es una de las más diversas y ampliamente distribuidas. México se considera uno de los centros de diversificación de esta familia, representando el 13% del total de la flora Mexicana (Rzendowski, 1972).

Las Asteraceae son químicamente diversas; algunos miembros de la familia acumulan terpenos y lactonas sesquiterpénicas (Stumpf y Conn, 1981), se han reportado más de 3000 estructuras diferentes dentro de la familia (Heinrich et al., 1998).

También se ha reportado la presencia de saponinas triterpenoides, ciclitoles, cumarinas y flavonoles (Trease y Evans, 1993), así como diterpenos tipo labdano y clerodano (Heywood et al., 1997) y por último poliacetilenos (Heinrich et al., 1998).

Dentro de esta familia se encuentra el género monotípico *Gymnosperma* que crece en regiones abiertas y semidesérticas, especialmente en México (Maldonado et al., 1994). Reyes reporta al género como endémico de México con base a la propuesta de Rzendowski en 1991 sobre Megaméxico 3.

### *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Asteraceae

Es una especie muy común en las tierras de cultivo en las regiones de la selva baja caducifolia y matorrales xerófilos ocasionalmente se encuentra en regiones de pino-encino. Forma poblaciones grandes y sobre todo en parcelas de cultivo abandonadas o en descanso.

Esta planta crece en zonas con perturbación asociada a vegetación secundaria y cultivos (Rzendowki y Resendowki, 1985).

Sinonimia popular:

Escobilla, jarilla, pegarrosa; Estado de México: tezoztla (náhuatl); Guerrero: xonequiletl, zacayauchi; Puebla: xincuite ; San Rafael: popote y Tepeji: tatalecho.

Sinonimia botánica:

*Selloa glutinosa* Sprengel, *Gymnosperma corymbosum* DC, *Gymnosperma multiflorum* DC, *Gymnosperma scoparium* DC, *Selloa multiflora* Kuntze.

### Descripción:

Subarbusto de hasta 1m de altura, erecto, glabro o casi glabro, glutinoso; tallos más o menos ramificados, estriados, hojas lineares a lanceoladas de 1 a 8.5 cm de largo y de 1 a 9 mm de ancho, agudas a acuminadas en el ápice, margen entero, trinervadas, densamente punteadas en ambas caras, sésiles o sobre pedúnculos hasta de 3 mm de largo; involucro de 9 a 15 brácteas elípticas a ovaladas, verdes en el ápice, las más largas de 4-5 mm de longitud; flores linguladas 5 a 9, sus corolas de 2-3 mm de largo, con el tubo largo y la parte laminar de 1mm de longitud o menos; flores del disco 4 a 6, sus corolas de 2.5 a 4 mm de largo, a menudo no todas fértiles; aquenios de 1-1.5 mm de largo (Rzendowski, 1985).

### Clasificación:

Cuadro 20. Clasificación de *G. glutinosum*

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Spermatophyta
SUBDIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Dicotyledoneae
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae
TRIBU	Astereae
GÉNERO	<i>Gymnosperma</i>
ESPECIE	<i>glutinosum</i>
NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreg.) Less

### Hábitat

Es una especie de hábito terrestre (Yu et al., 1988) y se encuentra asociada a

bosques de encino, de pino, mixto de encino-pino y pino-encino (Argueta et al., 1994), matorrales y pastizales, de preferencia en áreas perturbadas y en la vegetación secundaria (Rzendowski, 1985).

#### Uso popular:

Es una planta utilizada en el Estado de México, Durango y Guanajuato para tratar el reumatismo y dolor de pies (Argueta et al., 1994). Como uso general se ha reportado la utilización de las flores como antirreumático, contra la diarrea y como analgésico (SEMARNAT, 2001). En Puebla se utiliza como dolor de cabeza, jiones y piquetes de hormiga; también se utiliza cuando hay rotura de huesos en animales. Otros usos que se le asignan son contra la diarrea, fiebre amarilla y para soldar huesos, en Guerrero se utiliza para aplicar limpias a los animales (Argueta et al., 1994).

#### Distribución geográfica:

Es originaria de América Boreal Austral y Occidental, se encuentra en clima templado, entre los 2,250 y los 3,000 m.s.n.m.

Se distribuye a lo largo del Valle de México, Guatemala y de Arizona a Texas (Rzendowski, 1985) y es utilizada en el estado de Durango, México, Puebla, Guanajuato, Guerrero (Argueta et al., 1994), Zacatecas y Nuevo León (Aguilar et al., 1994).



Figura 19. Flores de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less



Figura 20. Flores *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less

#### Dosis

Como antidiarréico se utiliza en infusión al 10%, sin exceder de 100 mg a 1 g por día; como analgésico se aplica localmente sin exceder de 500 mg a 2.5 g

## APÉNDICE 2

### Zonas de colecta

#### **Zapotitlán Salinas**

Se localiza al sureste del estado de Puebla (Arias et al., 2000) y se encuentra dentro de la provincia florística de Tehuacán-Cuicatlán (Rzendowski, 1981). Se ubica entre los  $18^{\circ} 07' 18''$  y  $18^{\circ} 26' 00''$  latitud norte y  $97^{\circ} 19' 24''$  y  $97^{\circ} 39' 06''$  longitud oeste (INEGI, 1991). Se localiza a una altitud de 1500 a 2300 m.s.n.m. Se encuentra delimitado al oriente por las sierras de Atzingo y Miahuatepec, al norte por los cerros Chacateca y Pajarito, al poniente por el cerro La Mesa y al sur por el cerro Corral de Piedra (Arias et al., 2000).

De acuerdo con la clasificación climática de Köppen, modificada por García en 1973, presenta un clima Bshw'' (w)(e)g, que es un clima seco con régimen de lluvias en verano (García, 1988). La precipitación media anual de la zona es de 380 mm y la temperatura media anual es de  $21.2^{\circ}\text{C}$  (Arias et al., 2000). Existen tres tipos de vegetación en la zona: bosque espinoso, matorral xerófilo y bosque tropical caducifolio (Rzendowski, 1981). El tipo de suelo que presenta es comúnmente de yeso y caliza muchas veces con alto contenido de sales (Arias, 2000).

#### **San Rafael Coxcatlán, Puebla**

Se localiza al sureste del valle de Tehuacán, Puebla a  $18^{\circ} 12'$  y  $18^{\circ} 14'$  latitud norte,  $97^{\circ} 07'$  y  $97^{\circ} 09'$  longitud oeste, se encuentra a 957 m.s.n.m. (INEGI, 1984<sub>1</sub>).

Su clima es  $Bs_0 (h_1) W''(w) (e) g$ , corresponde al seco muy cálido o cálido, con lluvias en verano. Presenta una precipitación media anual de 450.7 mm además de una precipitación invernal menos de 5% con una temperatura media de  $24^{\circ}\text{C}$  (García, 1973).

Presenta una vegetación natural e inducida comprendida de matorral crucifera y cardonal (INEGI 1984<sub>1</sub>) y dominancia de gramíneas (García, 1981). Estas sobre roca sedimentaria en su mayoría arenisca y conglomerado (INEGI 1984<sub>2</sub>).

#### **Tepeji del Río, Hidalgo**

Sus coordenadas son  $19^{\circ} 54'$  latitud norte y  $99^{\circ} 21'$  longitud oeste, ubicado a una altitud de 2,175 msnm. El clima presenta en esta zona corresponde al  $Cw_0 (w)$  que es tipo templado subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación media anual de 704.5 mm y una temperatura media de  $15.8^{\circ}\text{C}$  (García, 1988).

Esta zona se encuentra gravemente afectada por la acción hídrica lo que se refleja en la poca vegetación, sólo existe la presencia de vegetación secundaria indicadora de la devastación de la zona (CETENAL, 1980).

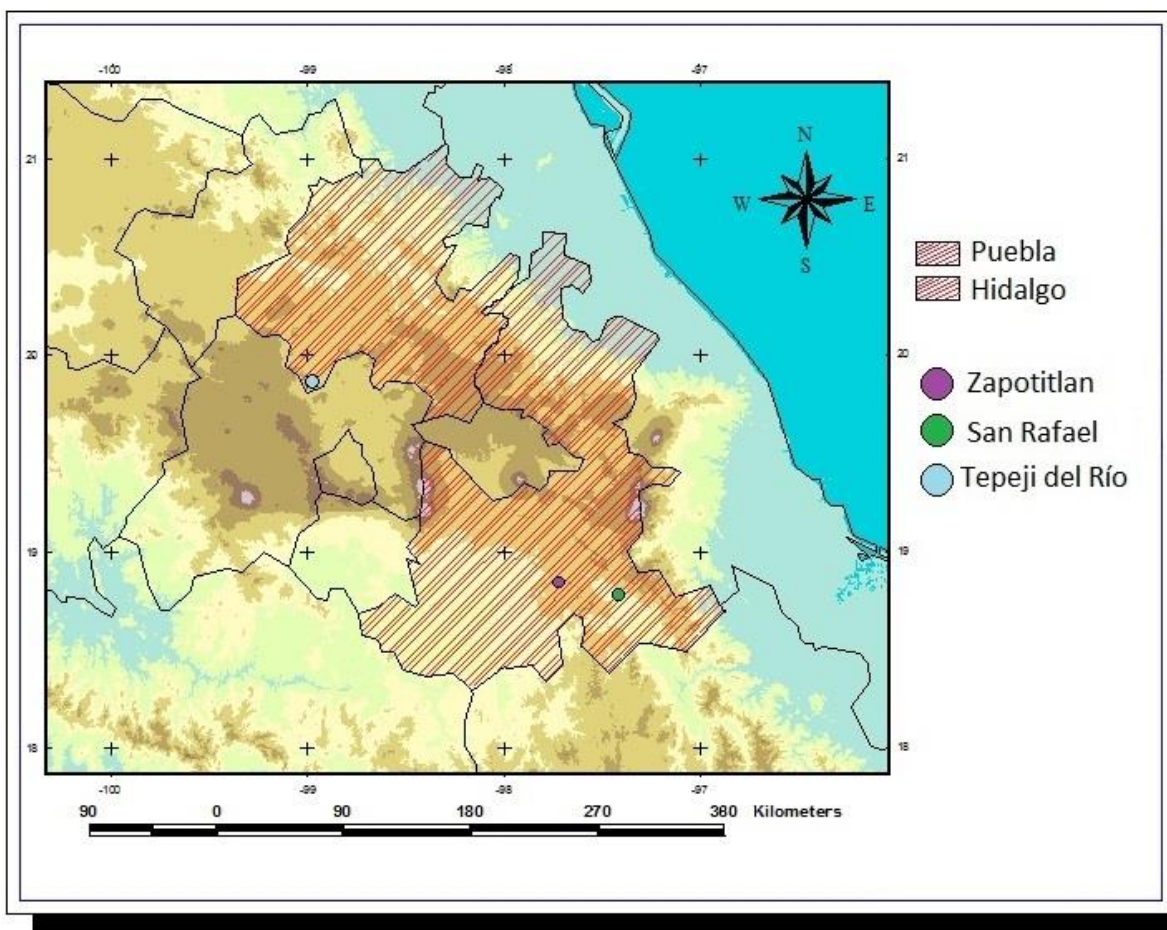


Fig 21. Zonas de colecta



## APÉNDICE 3

Inmersión rápida (Urzúa et al., 1998)

El material fresco se pesó y cortó, fue depositado dentro de un matraz al que se le agregó cloroformo hasta que la planta fue cubierta. Se dejó reposar a la planta con el solvente durante 15 segundos. Se obtuvo el extracto y se filtró. Para obtener el extracto libre de solvente, se realizó una destilación a presión reducida en un rotavapor.

## APÉNDICE 4

Método de difusión en agar o Kirby-BaU ( Venden Berghe y Vlietinck, 1991)

Para bacterias

Medio: se utilizó como medio el agar Muller-Hinton (Bioxon 110-1), este promueve el crecimiento de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente importantes. Es importante que el agar tenga un espesor uniforme de 4mm, de ser más fino el antibiótico tiende a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; si la placa del agar llega a medir más de 4 mm de espesor promueve una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, y esto tiende a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Inóculo: con un asa de siembra estéril se tocaron las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar. Se sumergió el asa en 10 mL de caldo Müller- Hilton (Bixon 260) se enjuagó bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retiró el asa de siembra. Se mantuvo el tubo en cultivo a 37° C durante aproximadamente 24 horas o hasta que la turbidez del medio fue equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ mL (este procedimiento se repitió para cada cepa).

El estándar 0.5 de McFarland se preparó añadiendo 0.5 mL de cloruro de bario a 99.5 mL de  $H_2SO_4$  0.36 N. Al comparar la turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos de estudio contra una cartulina blanca o con espectrofotómetro a 600 nm, si la suspensión de los organismos se veía más turbia que el estándar, se agregó solución salina al 0.9% hasta igualarlas. Posteriormente se sumergió un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se eliminó el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo.

Con este hisopo se inoculó la superficie de una placa de agar Müller-Hinton la que anteriormente fue templada. Finalmente, se sembró mediante estría cerrada por lo menos en tres direcciones, girando la placa en ángulos de 60° aproximadamente.

Cuando el inóculo se secó la placa está lista para probar las resinas.

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

Control negativo: se utilizaron sensidiscos con 10 µL de metanol dejándolo evaporar durante 12 h al igual que los experimentales.

Aplicación de extractos: Se utilizaron sensidiscos de 5mm de diámetro de papel Whatman del N° 5 (Previamente estériles). En todos los casos se hicieron las diluciones necesarias para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de extracto (2mg por sensidisco). Estos se colocaron manualmente en agar utilizando una pinza estéril.

Incubación: Una vez que las cajas con agar estuvieron preparadas para las pruebas de suceptibilidad, se colocaron en una incubadora a 35° C sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Es importante evitar la presión de CO<sub>2</sub> debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida de agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición.

Para Hongos

Medio: Para las cepas fúngicas se utilizó PDA como medio. El espesor de la placa debe alcanzar 4 mm (de no ser así puede ocurrir lo mismo que en el agar Müller-Hinton).

Aplicación de sustancias: Se emplearon sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5 para evaluar las resinas. En todos los casos se hicieron diluciones necesarias para que los sensidiscos llevaran la cantidad necesaria de resina ( 2mg/disco).

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias que se evaluaron, se colocó manualmente sobre la superficie del agar con ayuda de pinzas estériles.

Muestras: el vehículo para las resinas fue el metanol con el que fueron impregnados los sensidiscos hasta llegar a la concentración deseada ( 4mg/mL) por disco.

Posteriormente se impregnaron los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

Incubación: Las levaduras fueron cultivadas en una caja Petri con 20 mL de agar PDA, se colocaron en una incubadora a 35° C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>.

## APÉNDICE 5

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM)

Método de microdilución en caldo (Koneman 1996)

Sigue el mismo método de microdilución en agar, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determinó en la fase líquida, en una serie de microtúbulos moldeados en una placa de ELISA de noventa y seis pozos.

La placa se preparó colocando 50µL de caldo (Müller-Hinton) más extracto en cada celda a diferentes concentraciones experimentales (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.725, 0.315 mg/mL)

Se prepara la suspensión bacteriana de acuerdo al método descrito en el apéndice 4 hasta alcanzar el estándar de N° 0.5 de McFarland. De esta suspensión se tomaron 10 µL y se le adicionan 9.9 mL de caldo Müller-Hinton, obteniendo así una concentración de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL. Cada celda se inoculó con 50 µL de esta suspensión bacteriana. Una vez inoculada la placa se tapó para evitar la desecación y se incubó por 24 horas a 37°C.

Posteriormente se añadieron 50 µL a cada celda de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08% y se incubó a 37° C por 30 min. En las celdas donde se desarrollan los microorganismos, esta sustancia es reducida a formazán, produciendo una coloración rojiza-violácea, de lo contrario significa que no hay desarrollo bacteriano y la solución permanece clara. Es muy importante mantener protegida la placa de la luz debido a la alteración de los resultados.

Resultados: La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa una CMI y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la CBM. El ensayo se realizó por triplicado.

## APÉNDICE 6

Efecto de las resinas sobre la curva de crecimiento bacteriano (Muroi et al., 1993)

En un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton se obtuvo el inoculó de aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/mL (esto se obtiene en periodos de 24 horas e incubación). Se inoculó con ayuda de una micropipeta 10  $\mu$ L de la suspensión de bacterias en los tubos que contenían las resinas, estos tuvieron la concentración de CMI y sus múltiplos medios; es decir, la mitad de la CMI y CBM. La concentración final fue de aproximadamente  $1 \times 10^5$  bacterias/mL en cada tubo. Se incubó en una estufa sin presión de CO<sub>2</sub>. Se tomó una muestra las primeras 4 horas cada hora, después cada dos horas dos muestras y finalmente a las 12 y 24 horas. La duración del experimento es de 24 horas.

Para obtener los resultados se graficó el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las ordenadas "Y" contra el tiempo de incubación del eje de las abscisas "X", para así determinar el número de impactos necesarios para producir la muerte de la bacteria, se prolongó la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis y Dulbeco, 1996).

## APÉNDICE 7

Inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002)

Método cualitativo.

Para el ensayo contra hongos filamentosos se utilizaron cajas Petri (100 x 15 mm) con 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculó un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Se colocaron discos previamente impregnados con el compuesto activo, estos fueron colocados a una distancia de 30 mm del límite micelial.

Incubación: las placas fueron incubadas a 23°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se desarrolló.

Control positivo: se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7 µg/ disco de Ketoconazol.

Control negativo: Discos que fueron impregnados con 10 µL de solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

Interpretación de resultados: si existieran zonas de inhibición, se reportó el extracto como activo, en todos los casos las pruebas se realizaron por triplicado.

Método cuantitativo

Este ensayo se realizó en cajas de cultivo de 24 pozos, cada uno de estos contenía 1.5 mL de agar papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 6.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.50, 0.25, mg/mL, posteriormente se colocó un botón de micelio en el centro del pozo.

Incubación: las placas fueron incubadas a 23°C durante 72 horas (o hasta que creció el micelio).

Control positivo: se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo al agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol: 40, 50, 60,70, 80, 90y 100 µg/mL.

Interpretación de resultados: Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición será aquella en la que ya no hubo crecimiento micelial, la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF<sub>50</sub>. Este cálculo se realizó con un modelo matemático.

## APÉNDICE 8

Método de toxicidad general (Método modificado de Niño et al., 2006)

El ensayo se realizó con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). Se preparó una solución para un litro en el que se agregaron 5 g de NaCl y 2 g de NaHCO<sub>3</sub>, posteriormente se pesaron e incorporaron a la solución 0.5g de quistes de *A salina*.

Para hacer eclosionar los quistes deben cultivarse 24 a 48 horas con buena oxigenación, temperatura de 25°C aproximadamente y con presencia de luz.

Posteriormente se colocaron 10 larvas en frascos con 10 mL de solución salina al 0.5%, las concentraciones de los problemas a ensayar fueron 1000, 100 y 10 µg/mL.

Control negativo: se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual será el solvente para disolver el problema, se utilizó el mismo volumen que en el que se disolvió la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar.

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

Interpretación de resultados: se contó el número de larvas sobrevivientes, las cuales debieron desplazarse de la misma manera que el grupo testigo.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se determinó para cada extracto interpolándolo en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración de mg/mL a través del análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la CL<sub>50</sub> está entre los 1000 y 500 ppm (0.5 y 1 mg/mL), moderada cuando la CL<sub>50</sub> está entre 100 y 500 ppm (0.1 y 0.5 mg/mL) y señalado como fuerte cuando la CL<sub>50</sub> se extiende a partir de la 0 a 100 ppm (0 a 1 mg/mL) según el criterio de McLaughlin et al. (1998)

## APÉNDICE 9

Método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) (Método modificado de Murillo, 2006)

La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-100 ppm), por medio de espectrofotometría visible (VIS).

Aplicación de extractos: en la placa de ELISA se adicionaron 50µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-100ppm) por triplicado, el solvente utilizado fue metanol grado HPLC. Posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100µM; inmediatamente se protegió de la luz y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37°C . Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA (Método modificado de Murillo, 2006).

Blanco: pozos con 200µL e metanol.

Control positivo: Se utilizó catequina a las mismas concentraciones que el compuesto problema.

Interpretación de resultados: se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula y se grafica como se muestra en las figuras 22, 23 y 24:

% de reducción=  $(C-E/C)*100$  En donde: C= Abs del DPPH + metanol

E= Abs del experimental (Mezcla  
DPPH+ compuesto problema



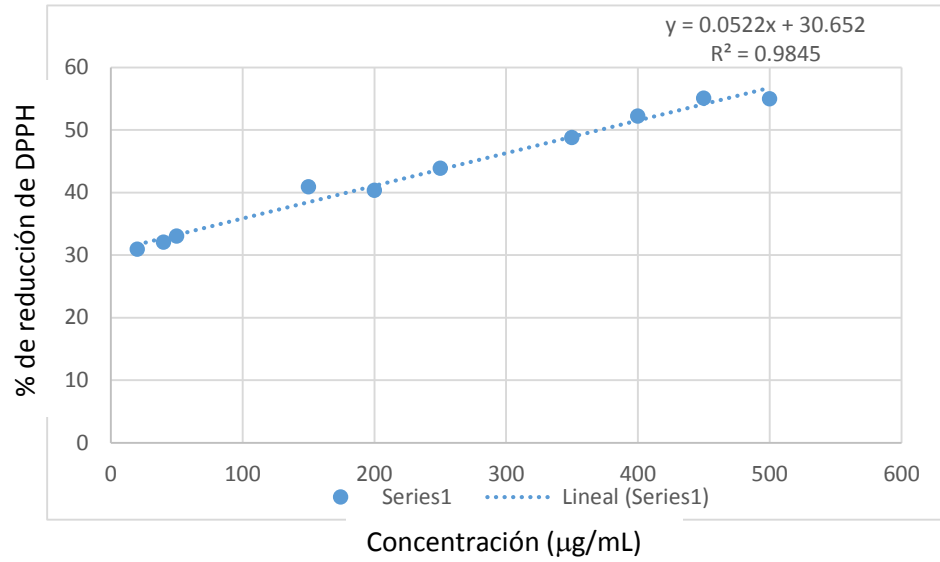


Figura 22. Actividad antioxidante de la resina de San Rafael

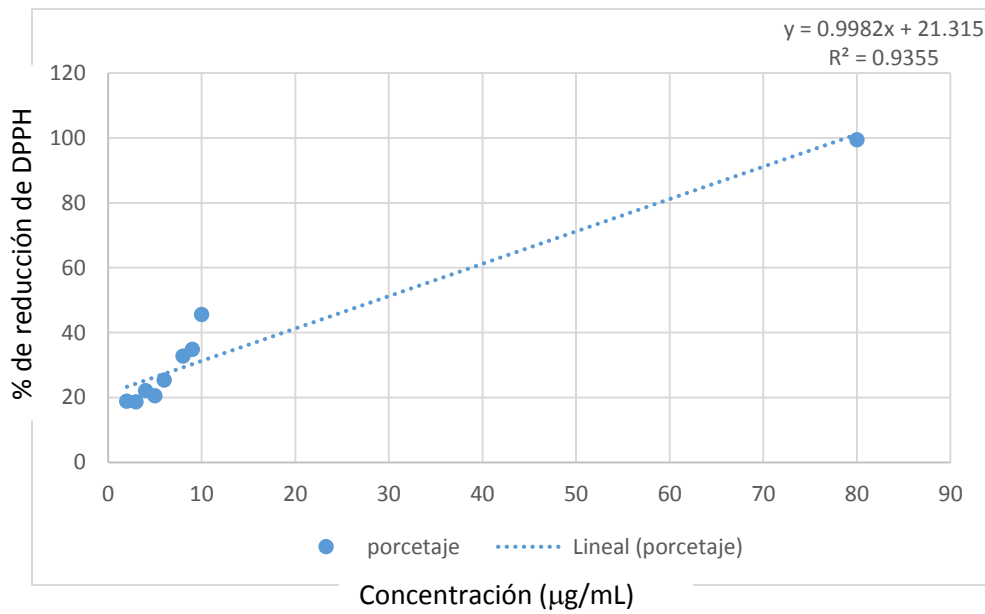


Figura 23. Actividad antioxidante de la resina de Tepeji

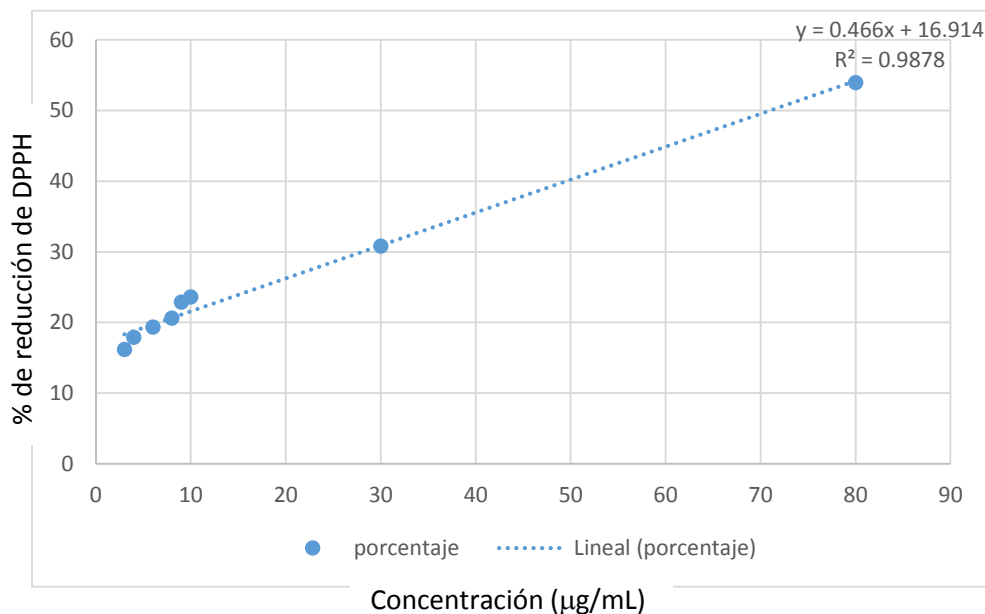


Figura 24. Actividad antioxidante de la resina de Zapotitlán

## APÉNDICE 10

Determinación de la concentración de fenoles totales (CFT)(Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utilizó fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6<sup>+</sup>. La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5<sup>+</sup> y 6<sup>+</sup>, formando una solución azul.

Se preparó una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales.

Se utilizó una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agregó el volumen

correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se preparó una solución estándar (0.2 mg/mL), se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L de esta y se agregan 750  $\mu$ L de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se tomó 1mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfirió a un tubo de ensayo con 7mL de agua destilada a continuación se adicionan 500  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añadieron 1.5 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L).

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 760nm. Cada concentración se determinó por triplicado.

Finalmente se graficó la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realizó un análisis de regresión lineal y se interpoló la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

### Curva patrón

Cuadro 21. Curva patrón para la determinación de fenoles totales

<b>Tubo (blanco)</b>	<b>B [Ácido gálico] mg/MI</b>	<b><math>\mu</math>L patrón</b>	<b><math>\mu</math>L agua destilada</b>	<b>mL Agua destilada</b>
<b>1</b>	0.00625	31.25 (31)	968.75 (968.5)	7
<b>2</b>	0.0125	62.5	937.5	7
<b>3</b>	0.025	125	875	7
<b>4</b>	0.05	250	750	7
<b>5</b>	0.1	500	500	7
<b>6</b>	0.2	1000	0	7
<b>P (problema)</b>	-	250	750	7

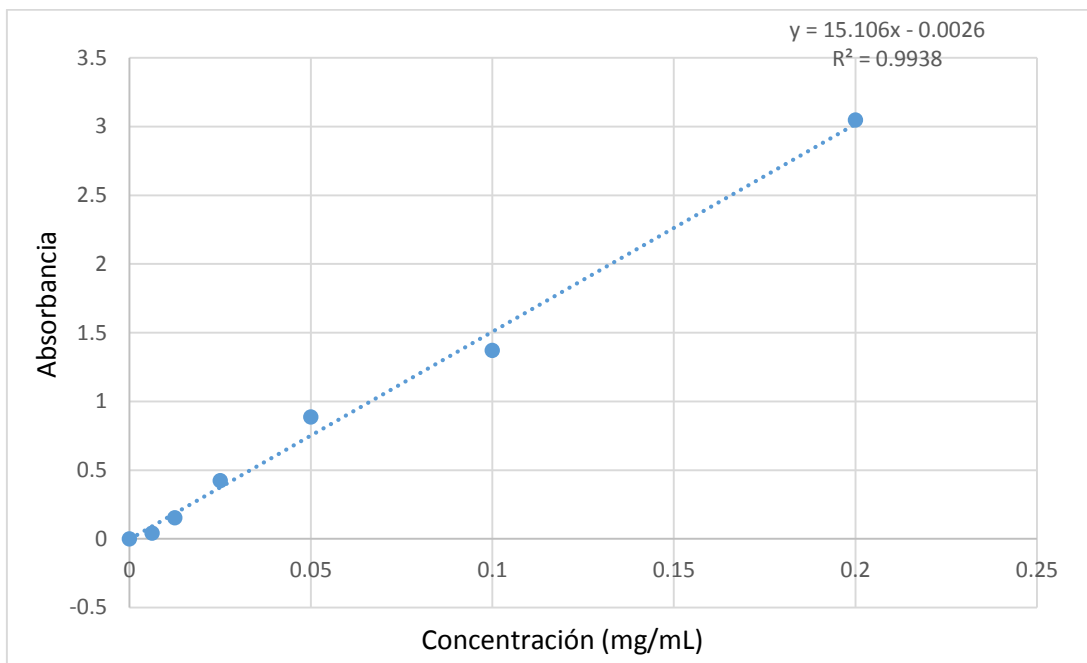


Figura 25. Curva patrón de ácido gálico

## APÉNDICE 11

Cuantificación de flavonoides Totales (Método de Dowd modificado de Praveen y Awang, 2007)

La concentración de flavonoides se midió por espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ). El catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides en metanol, produciendo en el análisis espectrofotométrico un desvío a longitudes de onda más largas y una intensificación de la absorción. Por lo tanto es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, en particular los ácidos fenólicos que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Esto se hace en un espectrofotómetro de 415nm utilizando cloruro de aluminio al 2 % en metanol. En estas condiciones, el complejo flavonoide-aluminio absorbe a una longitud de onda mucho mayor que el flavonoide sin presencia del agente complejante. Los ácidos fenólicos, incluidos los que forman complejos con  $\text{AlCl}_3$  absorben longitudes de onda mucho más bajas evitando así la interferencia con las medidas de absorbancia.

Se preparó una curva de calibración con quercetina, que es un flavonol muy abundante en la naturaleza dentro del grupo de los flavonoides y destaca por su elevada actividad antioxidante, consiste de 3 anillos y 5 grupos hidroxilo. Se utilizó una solución estándar de quercetina (1mg/1mL), a partir de esta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para las diferentes concentraciones (1-

100ppm, a cada una se le agregó el volumen correspondiente de metanol para alcanzar el volumen de 1 mL, posteriormente se adicionó a cada una 1 mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en metanol, para alcanzar el final de 2 mL.

Para el análisis de flavonoides totales del extracto, se preparó una solución estándar de 0.2 mg/mL en 1 mL de metanol. A la cual se le adicionó 1 mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en metanol, para alcanzar un volumen final de 2 mL. El blanco se preparó con un 1 mL del extracto en solución más 1 de metanol sin  $\text{AlCl}_3$ . El control negativo se preparó con 1mL de metanol más 1mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en metanol. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 415nm. Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto.

## APÉNDICE 12

### Antibiograma

En los siguientes cuadros se muestran a que antibióticos son S= Sensibles I= Intermedio o R= Resistentes las siguientes bacterias

Cuadro 22. Antibiograma bacterias Gram positivas

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B1533	<i>Eterococcus feacalis</i> ATCC 29212	<i>Actinomyces viscosus</i>
Cefalotina	S	R	R	S
Eritromicina	I	R	R	S
Ampicilina	R	R	R	R
Tetraciclina	S	R	R	S
Sulfametoxazol	S	S	S	S
Cefotaxima	R	R	R	R
Cefuroxima	R	R	R	R
Pefloxacina	S	I	R	I
Penicilina	R	R	R	R
Gentamicina	S	R	R	S
Ceftzidima	R	R	R	R
Dicloxacilina	R	R	R	R

Cuadro 23. Antibiograma bacterias Gram negativas

	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus miriabilis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
Nitrofurantoina	S	R	R	S	R	S	R
Cloranfenicol	R	S	S	S	R	S	S
Ceftriaxona	R	S	S	S	S	S	I
Ampicilina	R	S	R		I	R	R
Amikasina	R	S	S	S	S	S	R
Sulfametoxazol	S	R	S	S	S	S	S
Cefotaxima	R	S	I	I	S	S	I
Gentamicina	R	S	S	S	S	S	S
Cefalotina	S	S	R	R	R	S	R
Cefepime	R	S	S	S	S	S	I
Netilmicina	R	S	S	S	S	S	S
Levpfloxacina	S	S	S	R	S	S	S

## Referencias

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., López, M. E. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. México. Pp 49-50.
- Amoroso A., Di Conza J., Massa R., Power P., Radice M. y Gutkind G. 2006. Mecanismos de acción y resistencia a drogas antibacterianas. En: Basualdo J., Coto C. y de Torres R. Microbiología biomédica. Segunda ed. Buenos Aires: Atlante. p. 163-82.
- Andrews, J.H., Harris, R.F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surface. Annual Review of Phytopathology;38:145-180.
- Argueta, V. A., Cano, A. L., Rodarte, M. E. 1994. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana III. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. pp. 1318-1319.
- Arias, T. A. A., Valverde, V. M. T. y Reyes, S. J. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. 1ª edición. Instituto Nacional de Ecología. pp. 8-9, 22.
- Baquero, F., Coque, T.M. y De la Cruz, F. 2001. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. Antimicrob Agentes Chemother 55:3649-3660.
- Brehm-Stecher B.F., Johnson E. A. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apritone. Antimicrob. Agents Chemother. Vol 47, pp. 3357-3360.
- Briskin, D. 2007. Biotechnological methods for selection of high-yielding cell lines and production of secondary metabolites in medicinal plants. En: Kayser O., Quax, W. (Eds) Medicinal plant biotechnology . From basic research to industrial application, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 187-201 pp.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo, V. A., Avila, G., Duran, A. y Lira, R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. Journal of Ethnopharmacology. 97: 429-439.
- Canales M., Hernández T., Serrano R., Hernández LB., Durán A., Ríos U., Sigtist S., Hrnández H. L., García A.M., Angeles-López., Fernández-Araiza M.A. y Ávila G. 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. Journal of Ethnopharmacology. 21; 110(2): 343-7.

- Carrillo-Muñoz A. J, Tur, C., Estivill D., Montsant L., Carceller A., Hernández-Molina J.M. 1997. Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*. Revista Iberoamericana de Micología 14:50-54.
- Carson C.F., Mee B.J. Riley T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by timekill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 46, pp 1914-1920.
- Cartaya, O., Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales 22(2):5.14.
- Castilla, H. M. E. 1983. Estudio Florístico de Cerro Gordo (Próximo a San Juan Teotihuacán) y regiones aledañas. Tesis licenciatura en Biólogo. ENEP Iztacala. UNAM. Pp 107.
- Cebrian J., Torreclavero, R. y Guarga, J. 2002. Enciclopedia integral de plantas medicinales. EgesaRBA, Barcelona. Pp 6-11.
- CETENAL. 1980. Carta geológica. 1:50,000. E14-A18.
- Chambers H. 2006. Principios generales de la antibioticoterapia. En: Goodman, Gilman, editors. Las Bases farmacológicas de la terapéutica. Undecima ed. México: Mc Graw Hill;. P. 1096-109.
- Chambers H. 2007. Quimioterapéuticos. En: Katzung B, editor. Farmacología básica y clínica. Décima ed. México: Manual Moderno. p. 751-806.
- Chapman S. W, Cleary J. D, Rogers P. D. 2003. Amphotericin B. En: Dismukes W. E., Pappas P. G. & Sobel J.D, editors. Clinical mycology. Philadelphia, EUA: Oxford University Press;. pp. 33-48.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers., de Bruney, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology 79:213-220.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology 12(4), 564-582.
- Cué, B., Morejón, M. G. 1998. Antibacterianos de acción sistemática. Parte I. Antibióticos beta-lactámicos. Revista Cubana de Medicina General Integral. 14(4).
- Cushnie T.P. T., Lamb A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. The international Journal of Antimicrobial Agents. Vol. 26, pp. 343-356.
- Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg H. S., 1996. Tratado de microbiología 4ta edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona. 1559 pp.



- Díaz, P. M. 1997. Caracterización fisinómica ecológica de la Vegetación de la Subcuenca de Oriental Puebla-Tlaxcala-Veracruz. Tesis Lic. En Biología. UNAM. Campus Iztacala.
- Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411:843-847.
- Domingo, D., López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de quimioterapia*. 16 (N°4): 385-394 pp.
- Drago S. M., López L.M., Sainz E.T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37 (4), pp. 58-68.
- Errecalde, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s04.htm#TopOfPage> Fecha de acceso: Junio 2014.
- Evans, E. G. 1998. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 38:32-36.
- Fromtling, R. A. 1988. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical Microbiology Reviews*;1: 187-217.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. UNAM. México. 7- 45p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. UNAM. México. Pp 78

Gold, H. S. y Moellering, R.C. Jr. 1996. Antimicrobial-drug resistance. *The New England journal of Medicine* 335(19):1445-53.

- Gómez, M. I. 2011. Optimización del uso de los antimicrobianos: impacto en la evolución de la resistencia bacteriana y los costos hospitalarios. Tesis Doctoral en Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. 104 pp.
- Gonzalez G.J., Sánchez C. S., Tuñón M. J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*. 22(3), pp. 287-293.
- Gros, G. E. Pomilio, A. Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washinton. 147 pp.
- Hamburger, M., Hostettman, K. 1991. Bioactivity in plants: The link between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*. 30(12): 3864-3874.

- Heinrich, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz de Montellano, B., Rodríguez, E. 1998. Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). *Anual Review of Pharmacology and Toxicology* 38, 539-565.
- Heywood, V. H., Harbone, J. B., Turner, B. L. 1997. *The Biology and Chemistry of the compositae*. London: Academy press. Pp 1067- 1079.
- Horie, T., Ohtsuru, Y., Shibata, K., Yamashiata, K., Tsukayama, M., Kawamura, Y. 1998. <sup>13</sup>C NMR spectral assignment of the a-ring of polyoxygenated flavones. From *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 47: 865-874.
- Hudson, M.M. 2001. Antifungal resistance and over-the-counter availability in the UK: a current perspective. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 48:345-350.
- INEGI. 1984<sub>1</sub>. Carta uso del suelo y vegetación. 1:250,000. E14-6.
- INEGI. 1984<sub>2</sub>. Carta edafológica. 1:250,000. E14-6.
- INEGI. 1991. Carta topográfica. 1:250,000. E14-6.
- Keterene, D.R., Gray, A.I., Nash, R.J., Waigh, R.D. 2012. Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of *Combretaceae*. *Fitoterapia* 8(5): 932-940
- Koneman, W. E. 1996. *Diagnóstico Microbiológico*. Médica Panamericana. México. 439 pp.
- Laborda Rodríguez F. *Conceptos microbiológicos. Principios básicos de la farmacoterapia antibacteriana*. 2002. En: Argentina CF, editor. *Farmacología de las enfermedades parasitarias*. Capital Federal: Alfa Beta. 9 p
- Lago, J.H., Ito, A. T. Fernández, C. M., Young, M.C. Kato, M.J. 2012. Secondary metabolites isolated from *Piper chimonantifolium* and their antifungal activity. *Natural Product. Research*. 26 (8): 770-773
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer. United States of America. Pp. 427
- Laupland, K.B., Church D.L. & Mucenski, M. 2003. Population-based study of the f the Epidemiology of and the Risk Factors for Invasive *Staphylococcus aureus* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*. 187 (9): 1452-1459.
- Lock. U.O. 1994. *Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios*. Pontificada Universidad de Perú. Disponible en : <http://Plantas medicinales del perú- ANALISIS FITOQUIMICO Y METABOLITOS SECUNDARIOS . mgt>  
Fecha de consulta : junio 2014.

- López, S.M. 2012. Manual de plantas medicinales para Guinea Ecuatorial. Agencia Española de Cooperación Internacional para el desarrollo. España. 5p.
- Maldonado, E., Segura, C. R., Ortega, A., Calderón, J. S., Fronczek, F. R. 1994. Ent-labdane and neo-clerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 35:721-724.
- Marr K.A., Carter R.A., Crippa F., Wald A., Corey L. 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*; 34:909-17.
- Martínez, R., Calderón, J. S., Toscano, R. A., Valle, A. L., Mendoza, C. H. M. 1994. Ent-neoclerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 35:1505-1507.
- Martínez-Flórez, S.J., Gonzáñes-Gallego, J.M., Tuñón. 2002. Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria* (6) 271-278.
- Martins R., Pereire E., Lima JR. S., Senna M., Mesquita R., Santos V. 2002. Effect of comercial etanol propolis extra with the *invitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-Seropositive and HIV-seronegative Brazilian patiens with oral candidiasis. *Journal of Oral Science*. 44(1), pp. 41-48.
- Mason T.L. y Wasserman B.P. 1987. Inactivation of red beet bataglucans synthase by native diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean Pseudognaphalium (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 58, pp 85-88.
- Mateos, P. 2010. Agentes antimicrobianos y microorganismos. *Revista de microbiología y genética de la universidad de salamanca*. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a3-agentes\\_antimicrobianos\\_y\\_microorganismos.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a3-agentes_antimicrobianos_y_microorganismos.pdf) Fecha de acceso: Junio 2014.
- McLaughlin, J. L. 1991. Crow Gall Tumours on Potato disc and Brine Shrimp Lethality: Two simple Bioassays for Higher Plant Screening an Fractionation. En: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. (Ed), *Methods in plants Biochemistry assays for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, USA. pp. 1-32.
- Mellado E., Cuenca- Estrella M., Rodríguez-Tudela, J.L. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*;20(10):523-30.

- Mendoza, R.G. 2012. Efecto invitro de la flavanona Eridictiol presente en la resina de *Gymnosperma glutinosum* ( Spreng.) Less. Sobre *Naegleria fowleri*. Tesis licenciatura en Biología. UNAM Fes Iztacala. 53p.
- Mori C., Nishino N., Enoki N., Tawataa S. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*.26(8), pp 2231-2234.
- Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. *Revista Tecnológica*. Alfa Editores Técnicos. 27 pp.
- Muroi, H., Kubo, A., Kubo, I., 1993. Antimicrobial activity of cashew Apple flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:1106-1109.
- Niño, J., Correa Y. M. y Mosquera, O. M. 2006. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of 11 Solanaceae Plants from Colombia Biodiversity. *Pharmaceutical Biology* 44(1), 14-18.
- Núñez, R. J. E. 1990. Estudio Florístico de la Vertiente Oriental de la Sierra de Alcaparrosa en el Estado de México. Tesis Licenciatura En Biología. ENEP Iztacala. UNAM. 122 p.
- Olsen, D.E. 2003. Métodos ópticos de análisis. ED. Reverté. México, DF. 535p.
- Organización mundial de la salud. 2014. Farmacoresistencia. Disponible en: [http://www.who.int/drugresistance/Microbes\\_and\\_Antimicrobials/es/](http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/) Fecha de acceso: Junio 2014.
- Passerini de Rossi B. 2006. Transferencia de genes. En: Basualdo J, Coto C, de Torres R, editors. *Microbiología biomédica*. 2ª ed. Buenos Aires: Atlante. p. 163-82.
- Pelczar Jr. M. J. y Chan E. C. S. 1984. *Elementos de microbiología*. Mc Graw-Hill. Mexico. P. 334- 336.
- Peña-Cortés, H., Willmitzer, L. 1995. The role of hormones in gene activation in response to wounding. Pp. 395-414. En: P.J. Davis (ed). *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publiser. Dordrecht, The Netherlands. 833 p.
- Peña, J. M. C. 2009. Efecto in vitro de la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Sobre *Naegleria fowleri*. Tesis licenciatura en Biología. UNAM. Campus Iztacala p 33.
- Praveen K.R. y Awang B. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*., 2:(1) , pp. 70–80

- Reyes, 1993. Estudio Florístico en el Municipio de San Juan Mixtepec, Distrito de Juxtlahuaca, Oaxaca. Tesis licenciatura en Biología. UNAM. Campus Iztacala. pp 1,58.
- Rocha, A. I. F. 2002. Evaluación antibacteriana de algunas plantas medicinales utilizadas en la región de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis licenciatura en Biología. UNAM Campus Iztacala. 52 p.
- Romero, R. S. 1982. Estudio florístico de la Región de Huehuetoca, Estado de México. Tesis Biólogo. ENEP Iztacala. UNAM. 36 p.
- Royo, M. M. H., Melgoza, C. A. 2001. Listado florístico del campo experimental La campana y usos de su flora. CIRNOC-INIFAP-SAGARPA. 39(2)105-125.
- Ruddock, P.S., Charland, M., Ramirez, R. 2011. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Sexually Transmitted Diseases. 38(2): 82-88.
- Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., González-Maciel, A. 2012. In vitro activity of the F-6 fraction of oregano against *Giardia Intestinalis*. Parasitology. 139(4): 434-440.
- Rzedowski, J. 1981, Vegetación de México. Editorial Limusa. México. 432 p.
- Rzedowski, 1972. Contribuciones a la Fitogeografía florística e histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. Ciencias. México. 27:123-132.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la Flora fanerogámica del Valle de México. Acta Botánica Mexicana. 4:3-21.
- Rzedowski, J. y C de Rzedowsky G. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México Vol II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN e Instituto de Ecología. México. pp. 501, 581.
- Sánchez, G. A. 1998. Clasificación y ordenación de la Vegetación de la Sierra de Catorce, San Luis Potosí. Tesis M en C. ENEP Iztacala. UNAM. pp 170.
- Segado- Arenas, A., Alonso-Ojembarrena, A., Lubián-López, S.P., García-Tapia A.M. 2012. Phantoea agglomerans: ¿un nuevo patógeno en la unidad de cuidados intensivos neonatales?. Archivos Argentinos de Pediatría. 110 (4): 77-79.
- SEMARNAT. 2001. *Gymnosperma glutinosum*. Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacan, Guerrero y Oaxaca. Disponible en: [www.semarnat.gob.mx/pfnm/amplia.html](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/amplia.html).

- Sepúlveda-Jiménez, G. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21, 355-363.
- Serrano, R. P. 2004. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. De dos localidades: San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo. Tesis Licenciatura en Biología. UNAM. Fes Iztacala . 59 pp.
- Serrano, R.P. 2006. Variación espacio temporal de metabolitos con actividad antifúngica de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae), del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis Licenciatura en Biología. UNAM. Fes Iztacala.
- Sevilla, E., Escobar, I., Martínez, C., Pedrazal, L., Herrero, A. & Gutiérrez, R.1998. Estudio muticéntrico de utilización de antifúngicos en el paciente oncohematológico. *Farmacia Hospitalaria*, 22,188-96.
- Sheehan, D.J.; Hitchcock, C.A.; Sibley, C.M. 1999. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clinical Microbiology Reviews* , 12: 40–79.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela R.R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299: 152-178 pp.
- Soledad A. J. 2007. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Tesis Doctorado. Universidad de Granada, P 123.
- Soto, H. M. 2007. “Actividad antioxidante del tallo de oregano mexicano (*lippie graveolens* hbk var. *Berlandieri* Schafer)”. *Fitotecnica Mexicana* 30(1): 43-49.
- Stumpf, P. K., Conn, E. E. 1981. *The Biochemistry of plants*. Vol 7. A compresive the Compositae. Academic Press. New York. U.S.A. 619 p.
- Tenorio, L. P. 1997. Estudio florístico de la Cuenca de Río Hondo, Puebla Oaxaca, México. Tesis licenciatura en Biología. UNAM. ENEP Iztacala. pp. 1-26.
- Torres, C.M. 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza. España. 15-36 p.
- Trease, G. E., Evans, W. C. 1993. *Tratado de Farmacognosia*. 15ª ed. Nueva editorial interamericana McGraw Hill. México. pp
- Urzua A., Caroli M., Vasquez L., Mendoza L., Wilkens M. y Tojo E. 1998. Antimicrobial study of the resinus exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 62, 251-254.

- Vanden Berghe, D. A. y Vlietnick A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Hostettmann, K. (Ed). Methods in plant Biochemistry vol 6: Assay for Bioactivity. 47-69 pp.
- Wang, H. y Bun, N. T. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry. 61: 1-6.
- Yu, S., Fang, N. y Mabry, T. J. 1988. Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. Phytochemistry 27: 171-177.
  
- Zavaleta, M. G. 1996. Flora y evaluación ambiental de la barranca Arroyo Santa Cruz, Naucalpan, Estado de México. Tesis Licenciatura en Ecología. Universidad del Valle de México. pp. 65-112.