



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS  
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA DE LA FLOR DE *Prosopis laevigata*  
(Humb. et Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst.

T E S I S   P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ALICIA TERESA DE JESÚS CASTRO TREJO

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Margarita Canales Martínez



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, Agosto, 2016.



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.

## RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) campus Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Fue dirigido por el siguiente jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dra. María Margarita Canales Martínez.

M. en C. Ángel Durán Díaz.

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla.

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

Financiamiento: UNAM-PAPIIT IN211614

**El futuro tiene muchos nombres,  
para los débiles es lo inalcanzable,  
para los temerosos lo desconocido,  
para los valientes es la oportunidad.**

**Víctor Hugo**

**La soledad es necesaria para gozar  
de nuestro propio corazón y para amar,  
pero para triunfar en la vida  
es preciso dar algo de nuestra vida  
al mayor número de gentes.**

**Henri Beyle Stendhal**

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Dra. Margarita le agradezco de una manera especial, gracias por su apoyo, confianza, dedicación, asesoramiento, por abrirme la puerta hacia la investigación, por brindarme su gran experiencia y apoyo para llegar a la culminación de este trabajo que es una meta muy deseada, por todo lo que me ha brindado durante este pequeño tiempo, principalmente por aceptarme aún cuando ya tenía casa llena, por confiar en mí para realizar este proyecto, por ser gran profesora, persona y amiga que nos quiere como una gran madre y nos motiva a ser personas de 10 en la vida. La quiero mucho Doctora.

Al Dr. Marco Aurelio por su ayuda brindada para la realización de esta tesis, sus acertadas correcciones, valiosas aportaciones, por su amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio, en fin gracias por todo en verdad, también lo quiero mucho.

Al Dr. César Mateo Flores Ortiz por interesarse así como tomarse el tiempo para leer, corregir y enriquecer este proyecto.

Al M. en C. Ángel Durán Díaz por la ayuda con el análisis estadístico pues sin este no habría sido lo mismo.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla le agradezco la ayuda en los experimentos y sus correcciones.

A los laboratorios de Farmacognosia e Inmunobiología, por todas esas buenas experiencias y ayuda en la realización de los experimentos, por las buenas platicas, los seminarios, los exámenes de titulación, convivios, risas y todo lo que se vive con ustedes en esos laboratorios que mas que laboratorios son nuestra segunda casa, gracias por ese gran ambiente, gracias Esli, Emmanuel, Manuel y Rebe pues este proyecto también les pertenece por su ayuda para hacer el extracto, la limpieza de las flores y los consejos en la realización de los experimentos, a ti Fernando por todo el tiempo, ayuda y espacio que me brindaste en la realización de los cromatogramas que me ayudaste a hacer, por brindarme tu grandiosa amistad y esas tardes tan amenas y divertidas en Biogeoquímica y claro sin olvidar a todos ustedes chicos de Farma: Rebe, Ana, Karlita, Emmanuel, Manuel, Esli, Hatziri, Mara, Anahi, Alba, Michael, Marlene, José, Judith y a Inmuno: Gus, Judith, Rubén, Nelly, Fany, Pili, Less, Dani, Mario, Mike, Oscar, Alonso, porque de una u otra forma me ayudaron en la realización de este proyecto y me hicieron pasar grandiosos momentos en esa gran familia que son.

## DEDICATORIAS

Dedico el presente trabajo de investigación a mis padres por haberme dado tan valiosa herencia MIS ESTUDIOS, que es el fruto de esa semilla, que hace años sembraron en mí y que cultivan con su esfuerzo y dedicación, porque siempre me han apoyado incondicionalmente. Los amo.

Agradezco a Dios por dejarme estar más tiempo por aquí, permitirme vivir una vida normal y llevar hasta la culminación de mi tesis.

**Mami** esto es para ti, gracias infinitamente gracias por nunca darte por vencida, por todo el tiempo, dedicación y esfuerzo que has invertido en mí, por ser una mujer excepcional, luchona, y por creer en mí siempre, apoyarme y alentarme a ser una mejor persona, por esas platicas y consejos que me das, por todas tus enseñanzas y motivarme a ser mejor cada día, por tus frases que jamás en la vida olvidare, y enseñarme que si se vas a hacer algo hay que hacerlo bien sino lo mejor es no hacer nada, por alentarme a salir de mi zona de confort, esto también es tuyo pues sin ti no habría llegado hasta donde hoy estoy, te amo infinitamente, siempre serás mi mejor amiga y confidente, siempre.

**Papá** esto también es para ti, gracias por ser un gran hombre, por dedicar todos tus años, sin tener reparo alguno en sacar a la familia adelante, por hacer todo lo que estuvo a tu alcance para brindarme educación y cariño y

aunque en muchas ocasiones diferimos en las opiniones siempre me hace abrir los ojos y ver la vida tal cual es, gracias por todo el amor y apoyo incondicional, siempre te amaré la vida de papá.

**Jordanita** my Lil Sis, agradezco al cielo por regalarme una amiga de sangre, porque nuestro vinculo jamás se extinguirá, gracias por la confianza, por creer en mí y apoyarme en todo, ser mi cómplice y compañera, nunca cambies tu forma de ser tan llena de alegría, risas y sarcasmo, te hace única, siempre confía en ti, pues eres una niña muy inteligente que llegará muy lejos nunca dejes de ser perseverante y no te des por vencida, aunque no soy muy expresiva quiero que sepas que cuentas conmigo hoy, mañana y siempre. Te amo.

**Tía Socorro** no tengo palabras para decirte lo mucho que aprecio y estaré en deuda pues hiciste mucho para que estuviéramos bien, estaré agradecida contigo toda la vida, eres una gran persona, que ayuda sin pedir nada a cambio, te quiero tía.

**Sra. Mica †** infinitas gracias por todo lo que hizo por mí y mi mamá, estaré en deuda con usted toda la vida y eternamente agradecida, ya que sin usted no estaríamos aquí.

**Familia Trejo Santiago:** gracias familia, por siempre estar unidos sin importar las circunstancias y problemas que existan, los quiero a todos por igual; tía Lupe y Martin gracias por sus consejos, tía Bertha gracias por

siempre estar al pendiente de todos aunque te encuentres muy lejos, tía Lulú gracias , Chelita † siempre estarás en mi corazón, gracias por tu personalidad y sentido del humor tan peculiar, por siempre ver el lado bueno de la situación y estar orgullosa de nosotras, tía Coy y Memo gracias por estar orgullosa, por darnos tu apoyo y consejos cuando los pedimos y de todos, a ti tío por tu gran sentido del humor y siempre sacarnos una gran risa y cuidar a la familia, a mi tío-padrino Coco por a mis primas y primos Cristina, Mary, Fabián, Memito, Rocorito, Jorge, Comino, Moreno, Nanin, Frank, por los momentos compartidos, risas y esa infancia tan divertida a lado de ustedes y sin olvidar claro a la base de nuestra familia a mis abuelos Faustinito con esas historias de las cuales siempre te dejan alguna enseñanza, por tu buen humor y cariño, por último pero no menos importante a ti Teofi † por todo el cariño, esfuerzo, dedicación, y sacrificio al hacer todo lo que estuvo en tus manos para que la familia siempre estuviera unida y con salud, siempre te querré y llevare en mi corazón. Los quiero mucho familia.

**Padrinos Paty y Sergio:** gracias por ser mis padrinos pues como su nombre lo dice, ustedes también son mis padres y agradezco el interés, cariño y atención que me han brindado toda mi vida y no solo a mi sino también a mis padres y hermana y por sentirse orgullosos de mi en todo momento, por estar en cada logro y meta cumplida, gracias, los quiero mucho.

**Vicky:** gracias prima por cuidarme en todo momento y cuidar a mi familia, tu sabes a que me refiero, por tu confianza, consejos y platicas a pesar de no

estar juntas en todo momento se que cuento contigo para todo, te quiero prima.

**Familia Castro** gracias a ustedes abuelos Jorge y Virginia a mis tías; Socorro, Mónica, Rocío y Diana, a mi tío Marcos, a mis primos; Marcos, Jonathan y Carlos, a mis primas; Vicky, Mene y Monse, por estar siempre orgullosos de mi y apoyarnos cuando se necesita.

### **A mis amigos:**

**Chris:** dicen que si una amistad dura más de 7 años, esta será para toda la vida y querido nosotros ya llevamos más de eso así que solo me queda darte las gracias, por quererme y estar para mí incondicional siempre te querré mucho mucho, espero que la vida nunca nos separe, pues te quiero en ella ´por siempre, por ayudarme, apoyarme y quererme aun cuando no te lo pedía, por tus chistes a costa mía y tu gran sinceridad, por esa amistad tan sincera, te quiero (till the sky falls down).

**Andy:** amiga mía gracias por tan valiosa amistad que tenemos, por todas las circunstancias que nos llevaron a ser las grandes amigas somos hoy, por tus sabios consejos, por siempre tener tiempo para escucharme, por las altas y bajas, por esas divertidas aventuras que vivimos, sin ti la carrera no habría sido lo mismo y aunque la vida nos lleve por caminos distintos siempre serás una valiosa persona en mi vida. Te quiero mucho amiga.

**Verito:** amora gracias por tu inmensa amistad, por ser mi primer amiga en CCH, por apoyarme en todo momento y ser siempre tan linda conmigo, aunque nuestros caminos se hayan separado y no nos frecuentemos como antes siempre contarás conmigo para todo, te quiero amora.

**Abisag:** gracias por tu amistad, por ser mi confidente, cómplice y ser el dúo dinámico durante la secundaria pues te convertiste en mi mejor amiga y aun lo eres, gracias por tus valiosos consejos y aunque estuvimos un tiempo distanciadas, eso no cambio el sentimiento de nuestra amistad, espero tener siempre tu amistad pues eres una gran persona y mamá, te quiero.

**A mi mejor amigo de CCH Miguel:** gracias por tu amistad, por esos momentos valiosos que vivimos, por ser el mejor compañero de francés y de esas horas libres que nos hicieron ser los mejores amigos, siempre contarás conmigo aunque nos veamos cada mil años, te quiero mucho.

**Daniie:** gracias amiga por el tiempo que convivimos fue maravilloso, tu amistad, apoyo y aventuras vividas dentro y fuera de la carrera, siempre contarás conmigo para todo, aunque la vida nos lleve por distintos caminos siempre estaré para ti, te quiero amiga.

Por último pero no por eso menos importante, pues dicen que lo mejor viene al último, ustedes dos mis amores y mejores amigos de la carrera: **Manuel** y **Emmanuel** (por ayudarme a entrar al labo, tu sabes a lo que me refiero) gracias por todo y por tanto que han hecho por mí, por hacer de

este poco tiempo tan especial, por las risas compartidas, y las tardes tan amenas y siempre llenas de risas, por hacerme reír aun cuando no tenía ganas, por los consejos, los aprendizajes, tropiezos, por las experiencias, su gran compañía y sobre todo por el cariño que me brindan día a día, por convertirse en tan poquito tiempo en mis mejores amigos, los quiero infinitamente amores.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
Material y Métodos .....	22
Colecta de material .....	22
Obtención del extracto metanólico .....	22
Pruebas biológicas .....	23
Evaluación de la actividad antibacteriana .....	23
Evaluación cualitativa.....	24
Evaluación cuantitativa .....	24
Efecto del extracto de la flor de mezquite sobre la curva de crecimiento bacteriano .....	24
Toxicidad general del extracto usando el modelo de <i>Artemia salina</i> .....	24
Pruebas químicas .....	25
Contenido de fenoles totales (CFT).....	25
Contenido de flavonoides totales .....	25
Evaluación de la capacidad antioxidante .....	26

Evaluación cuantitativa de alcaloides.....	26
Cuantificación de xantofilas totales por espectrofotometría.....	26
Perfil de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). .....	27
Caracterización fitoquímica del extracto .....	27
Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) .	27
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	27
Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM).....	27
Análisis estadístico .....	28
RESULTADOS.....	29
Rendimiento del extracto metanólico .....	29
Evaluación cualitativa.....	29
Evaluación cuantitativa .....	33
Actividad del extracto en la curva de crecimiento bacteriano.....	34
Contenido de Fenoles Totales .....	37
Contenido de Flavonoides Totales .....	37
Actividad antioxidante del extracto.....	38
Evaluación cualitativa de alcaloides .....	38
Cuantificación de xantofilas totales por espectrofotometría.....	38
Cuantificación de la proporción de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	39
Análisis químico.....	40
Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	40
Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).....	43
Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-EM).....	46

DISCUSIÓN .....	48
CONCLUSIÓN.....	54
APENDICES .....	55
Apéndice 1 .....	55
Apéndice 2 .....	59
Apéndice 3.....	62
Apéndice 4.....	65
Apéndice 5.....	67
Apéndice 6.....	69
Apéndice 7 .....	71
Apéndice 8.....	74
Apéndice 9.....	77
Apéndice 10 .....	80
Apéndice 11 .....	81
Apéndice 12.....	83
Apéndice 13.....	85
Apéndice 14 .....	87
Apéndice 15.....	89
REFERENCIAS .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Extracto metanólico crudo.....	22
<b>Figura 2.</b> Destilación del extracto metanólico crudo en el rotavapor.....	22
<b>Figura 3.</b> Gráfico de los halos de inhibición de <i>P. laevigata</i> y el control positivo Cloramfenicol sobre bacterias Gram positivas y negativas.....	29
<b>Figura 4.</b> Halos de inhibición de <i>P. laevigata</i> (sensidiscos amarillos) y el control positivo Cloramfenicol (sensidiscos blanco) en A) se puede observar que los halos de inhibición son del mismo tamaño, mientras que en B) son mayores los de <i>P. laevigata</i> y en C) los halos de cloramfenicol son mayores que los de <i>P. laevigata</i> .....	31
<b>Figura 5.</b> Diagrama de caja de la longitud promedio de los halos de inhibición de cloramfenicol y <i>P. laevigata</i> .....	31
<b>Figura 6.</b> Diagrama de caja de la longitud promedio de los halos de inhibición por cepa bacteriana.....	32
<b>Figura 7.</b> Actividad del extracto de <i>P. laevigata</i> sobre algunas cepas bacterianas durante el ensayo de CMI y CBM.....	34
<b>Figura 8.</b> Actividad del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
<b>Figura 9.</b> Actividad del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> sobre la curva de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> .....	36
<b>Figura 10.</b> Se muestra la actividad del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> sobre la curva de crecimiento bacteriano en A) al tiempo 0 hubo poco crecimiento bacteriano y C) al tiempo 5 ya no hubo crecimiento ambas pertenecen a <i>S. aureus</i> mientras que B) al tiempo 2 ya no hubo crecimiento bacteriano y en D) al tiempo 5 continuo con el mismo comportamiento estas pertenecen a <i>V. cholerae</i> .....	36
<b>Figura 11.</b> Prueba cualitativa de alcaloides por reactivo de Meyer.....	38
<b>Figura 12.</b> Cromatograma del análisis HPLC de pigmentos del extracto de <i>P. laevigata</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> .....	42
<b>Figura 14.</b> Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> .....	45
<b>Figura 15.</b> Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-EM) del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> .....	47
<b>Figura 16.</b> Mezquite <i>Prosopis laevigata</i> .....	55
<b>Figura 17.</b> Fruto, hojas y flores de <i>P. laevigata</i> .....	56
<b>Figura 18.</b> <i>P. laevigata</i> (Palacios, 2006) a) pinna, b) foliolo, c) fruto, d) semilla.....	57
<b>Figura 19.</b> Distribución de Mezquite <i>P. laevigata</i> .....	57
<b>Figura 20.</b> Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán.....	59
<b>Figura 21.</b> Curva patrón de ácido gálico.....	73
<b>Figura 22.</b> Curva patrón de quercetina.....	76
<b>Figura 23.</b> Actividad antioxidante del extracto MeOH por reducción del radical DPPH.....	80

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Cepas de bacterias evaluadas en la prueba cualitativa.....	23
<b>Cuadro 2.</b> Halos de inhibición de <i>P.laevigata</i> y de Cloramfenicol.....	30
<b>Cuadro 3.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	33
<b>Cuadro 4.</b> Porcentaje de letalidad de <i>Artemia salina</i> sobre el extracto de <i>P. laevigata</i> .....	36
<b>Cuadro 5.</b> Espectro UV con el pico máximo de absorción de pigmentos de <i>P. laevigata</i> .....	39
<b>Cuadro 6.</b> Compuestos mayoritarios del extracto metanólico <i>P. laevigata</i> .....	40
<b>Cuadro 7.</b> Espectros de UV con los picos máximos de absorción de <i>Prosopis laevigata</i> .....	43
<b>Cuadro 8.</b> Compuestos del HPLC-EM del extracto de <i>P.laevigata</i> .....	46

## RESUMEN

El ser humano en su interacción con la naturaleza ha usado y usa de diversas maneras los recursos que en ella encuentra. La utilización medicinal de las plantas tiene su origen desde el inicio de la historia del ser humano sobre la tierra que, en íntimo contacto con la naturaleza, se fue desarrollando con la imitación de las costumbres de otros animales y con la experiencia acumulada tras la ingestión accidental o voluntaria de algunas especies vegetales, durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían todas las culturas, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán el mezquite (*Prosopis laevigata*) es un recurso valioso utilizado principalmente como forraje, combustible, maderable y medicinal.

Es importante resaltar que no se han realizado estudios previos sobre la actividad antibacteriana de la flor de mezquite siendo este el objetivo principal. Se obtuvo el extracto metanólico de la flor de mezquite, se evaluó cualitativamente la actividad antibacteriana, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se evaluó la sensibilidad de las cepas sobre la curva de crecimiento bacteriano, se determinó la toxicidad general, se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides totales, se determinó la actividad antioxidante, se comprobó la presencia de alcaloides, se realizó la cuantificación de xantofilas por espectrofotometría, se realizó la cuantificación de la proporción de xantofilas por medio de una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se realizó la caracterización química del extracto por medio de una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y una cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM).

Como resultados se obtuvo el extracto metanólico de la flor de mezquite que mostró actividad inhibitoria en bacterias Gram positivas y negativas con halos de inhibición de hasta 21 mm. Las cepas más susceptibles fueron *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* (CMI=0.312 mg/mL, 0.625 mg/mL y CMB=0.625 mg/mL, 1.25mg/mL respectivamente). La cinética bacteriana demostró que el extracto presentó actividad bactericida para ambas especies a partir del primer tiempo. La prueba de toxicidad demostró que presenta toxicidad fuerte para la larva nauplio II de *Artemia salina* desde la concentración más baja (10 ppm) con un 96% de mortalidad. El contenido de fenoles totales fue de 61.29 mg eAG/g, lo que representa el 1.18% del extracto, el contenido de flavonoides totales fue de 3.64 µg eQ/g y la capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>) mostrada en el ensayo de reducción de DPPH fue de 591.389 µg/mL. Se comprobó la presencia de alcaloides, xantofilas con 0.18 g/Kg de extracto que representa el 0.018% del extracto y la presencia de luteína por medio de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la caracterización química del extracto de flor de mezquite por medio de diferentes cromatografías nos mostró que los compuestos detectados en mayor abundancia en la CG-EM son ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico mientras que en la HPLC son flavonas, flavonoles, isoflavonas, ácidos fenólicos, dihidrochalconas, flavanonoles y fenil propanoides, la HPLC-EM nos mostró que el extracto de la flor posee muchos compuestos pero los que se pudieron identificar fueron Vainillina, Acacetina, Crisina y Acido cafeíco.

Como conclusión, podemos decir que se proporcionan por vez primera resultados satisfactorios que demuestran la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la flor de mezquite.

**Palabras clave: mezquite, *Prosopis laevigata*, actividad antibacteriana.**

## INTRODUCCIÓN

El ser humano en su interacción con la naturaleza ha usado y usa de diversas maneras los recursos que en ella encuentra. (Rosas, 2003). La utilización medicinal de las plantas tiene su origen desde el inicio de la historia del ser humano sobre la tierra que, en íntimo contacto con la naturaleza, se fue desarrollando con la imitación de las costumbres de otros animales y con la experiencia acumulada tras la ingestión accidental o voluntaria de algunas especies vegetales (Cruz, 2007), durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían todas las culturas (Quesada, 2008).

La medicina tradicional es una herramienta muy valiosa en beneficio de la salud por lo que es fundamental resguardar este acervo de conocimientos de gran valor científico y cultural (Encarnación, 2010), transmitido de generación en generación y les ha valido su eficacia la permanencia dentro de cada cultura cuya fuente podría ser disímil pero el mismo principio activo (Rodríguez, 2014), siendo considerada como la suma de todos los conocimientos teóricos y prácticos, explicables o no, utilizados para diagnóstico, prevención y supresión de trastornos físicos, mentales o sociales, basados exclusivamente en la experiencia y la observación, y trasmitidos verbalmente o por escrito de una generación a otra (Encarnación, 2010)

Actualmente se pretende, sin menospreciar la sabiduría popular, razonar y justificar el uso de las plantas medicinales con base en el conocimiento científico derivado del estudio farmacológico y de la experimentación clínica y se ha denominado a esta ciencia médica como Fitoterapia (Cruz, 2007).

Desde hace unos años la investigación de plantas medicinales ya no es vista como un folklore, sino, como una relevante actividad científica la principal estrategia desarrollada para lograr la integración de las medicinas tradicionales a los tratamientos, ha sido la investigación para comprobar su eficacia. Además capacita recursos humanos

especialistas en medicina tradicional (Esquivel, 2012) así mismo el incremento en el uso se atribuye a la constante del hombre por tener una vida más sana y en armonía con lo natural (Encarnación, 2010), ya que las plantas medicinales son una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, en la obtención de nuevas moléculas bioactivas que se manifiesten en diferentes mecanismos de acción (Ramírez, 2012), demostrando que pueden presentar una gran variedad de metabolitos secundarios como los aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cetonas y flavonoides (Esquivel, 2012) así como efectos farmacológicos, entre los que se incluyen antiinflamatorios, vasodilatadores, antimicrobianos, anticonvulsivos, sedantes, antipiréticos y aproximadamente el 40 % de los medicamentos actuales derivan de plantas medicinales y otros productos naturales empleados tradicionalmente (Encarnación, 2010) ayudando para el tratamiento de cáncer, enfermedades gastrointestinales, dérmicas, del sistema nervioso central, cardiovasculares y diabetes, entre otras (Esquivel, 2012).

Una propiedad vital de las plantas es su capacidad de sintetizar un elevado número de compuestos químicos o principios activos (se han identificado hasta el momento unos 12000 diferentes); cuya función es primordial para la planta como adaptación al medio en que vive, a las condiciones atmosféricas, resistencia frente a otras plantas o animales, atracción o defensa frente a insectos. Este es el origen fundamental de los innumerables principios activos de las plantas y sus infinitas posibilidades terapéuticas (Cruz, 2007).

Los medicamentos de síntesis química resultan de la obtención de un solo principio activo de carácter inorgánico o mineral, normalmente con una única acción terapéutica rápida, exacta, específica, potente y eficaz pero que puede dañar al organismo humano limitando su absorción, dañando órganos, provocando alergias e inclusive adicción, las plantas medicinales en cambio se caracterizan por aportar al organismo múltiples principios activos que al tratarse de moléculas orgánicas se absorben en general más fácilmente y su efecto depende de la acción conjunta de variadas sustancias que se

potencian y equilibran mutuamente pudiendo beneficiar a diferentes órganos o funciones del organismo, si bien su acción es más lenta será más persistente en el tiempo, no es frecuente la aparición de efectos secundarios (Cruz, 2007).

En el resurgimiento de la importancia de las plantas medicinales como fuente de potenciales terapéuticos, son los países del primer mundo quienes invierten grandes cantidades de dinero en la investigación farmacológica de plantas medicinales, obteniendo la materia prima vegetal de los países tropicales generalmente en desarrollo (Ramírez, 2012).

El crecimiento de la Industria farmacéutica y la producción de fitofármacos que invaden el mercado nacional e internacional, no ha disminuido la importancia de las plantas medicinales mexicanas; por el contrario, la población de los países en desarrollo y aún los industrializados muestran un interés creciente por la medicina tradicional y la medicina complementaria alternativa, ampliando su aplicación y el uso de los productos derivados de éstas (Encarnación, 2010).

En países como China, India y Tailandia se han conseguido avances significativos en la articulación de modelos integrales de salud, mientras que en algunos países de América Latina como México, Nicaragua y Brasil tienen experiencias interesantes con avances hacia la integración de las medicinas tradicionales en la medicina moderna (Esquivel, 2012).

En México, la mayor parte del conocimiento tradicional que se tiene acerca de las plantas medicinales proviene desde la época prehispánica y actualmente 52 grupos étnicos lo conservan (Esquivel, 2012; Rodríguez, 2014).

Dicho atributo deriva de poseer una de las floras más complejas y variadas; el número de especies oscila entre 22 000 y 31 000, mismas que en parte le confieren el carácter

megadiverso al país. De estas especies 4 000 (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa (Rodríguez, 2014).

A pesar de que los medicamentos herbolarios se han empleado durante muchos siglos, como los referidos en el Códice Badiano escrito en Náhuatl y traducido al Latín por el médico indígena Martín de La Cruz en el siglo XVI, sólo una cantidad relativamente pequeña de plantas mexicanas se han estudiado para su posible aplicación médica y es menor aún el número de plantas medicinales sobre las que se han realizado estudios de eficacia, seguridad, de sus principios activos y del tipo de extractos que los contienen (Encarnación, 2010).

Debido a esto, México es reconocido como uno de los centros de domesticación de plantas más importantes del mundo, aspecto determinado en buena medida por la notable diversidad cultural y riqueza biológica que caracterizan al país y que son de los más sobresalientes del planeta (Rosas, 2003), al igual que es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal (Franco, 2014).

Las investigaciones realizadas en nuestro país con plantas medicinales, se han desarrollado de sobremanera en la última década, indicativo de la importancia de la medicina tradicional mexicana. Actualmente, los reportes indican la existencia de literatura científica que avala el uso de las plantas, sus extractos o sus compuestos activos contra diversas enfermedades como la diabetes, hipertensión y cáncer, o con propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiprotozoarias, relajantes y sedativas (Esquivel, 2012).

Una zona importante en el país es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en esta región se ubica una de las reservas bióticas más relevantes de México. En 10,000 km<sup>2</sup> de superficie,

probablemente posee la mayor diversidad biológica (2,700 especies de plantas vasculares) de las zonas áridas de Norteamérica. En esta zona prospera entre 10 y 11.4% de la flora mexicana, con 365 especies endémicas que representan 13.9% del total, mientras que más de 25% de las plantas vasculares del valle se usan por diferentes comunidades humanas que habitan la región. Por otro lado, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán también posee una importante diversidad cultural (Canales et al., 2006). Dentro de este Valle se encuentra la comunidad nahua de San Rafael, que pertenece al municipio de Coxcatlán (Rosas, 2003), la vegetación dominante es el matorral espinoso con especies como *Bursera morelensis* Ramírez, *Bursera aptera* Ramírez, *Pachycereus weberi* (J.M.Coult.) Backeb., *Opuntia puberula* Pfeiff, *Ceiba parviflora* Rose, *Acacia cochliacantha* Humb. & Bonpl. y *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst., en la comunidad se tienen estas especies como flora útil siendo entre las forrajeras y combustibles el mezquite la especie más importante (Dávila, 2002), además que la comunidad se dedica principalmente a la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar, también se dedican a la ganadería menor de ganado caprino, pollos y guajolotes, la recolección de frutos, semillas, leña de mezquite considerada de primera calidad, en virtud de que produce brasas y madera para diversos fines como construcción de viviendas, cercas, cuartos, techos y postes (Dávila, 2002; Rosas, 2003).

Dentro de las plantas utilizadas por la comunidad se encuentra al género *Prosopis*, en México es conocido con el nombre común de mezquite, que proviene del náhuatl *micuitl* y probablemente los aztecas le dieron el nombre a estas plantas. Este género contiene poco más de 40 especies nativas de regiones áridas y semiáridas de Norte y Sudamérica, África y Asia, con individuos desde 40 cm hasta 20 m de altura, pudiendo crecer en zonas con lluvias menores a los 100 mm anuales y soportando en verano temperaturas máximas promedio superiores a 40 °C (De La Torre-Almaraz, 2009).

En México hay 10 especies de mezquite: *P. palmeri*, *P. reptans* var. *cineroscens*, *P. pubescens*, *P. articulata*, *P. laevigata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. glandulosa* var. *típica*, *P. glandulosa* var. *torreyana* y *P. mexicanum* (De La Torre-Almaraz, 2009).

*Prosopis laevigata* se encuentran principalmente en Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Distrito Federal, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas (Flores, 1993).

Los mezquites constituyen parte importante de la flora nacional, alcanzando inclusive carácter predominante en ciertas regiones; han estado ligados con la vida del campesino mexicano desde tiempos remotos. Entre las adaptaciones del mezquite a los ambientes áridos se encuentra la amplitud y profundidad de su sistema radicular, así como la reducción de su sistema foliar. La forma de vida arbórea indica disponibilidad de agua subterránea a poca profundidad, por lo que los campesinos lo utilizan como indicador de posibles fuentes de agua; la forma arbustiva se relaciona con manto freático profundo (Rodríguez et al., 2014).

La vegetación de mezquite *Prosopis laevigata* cumple una función relevante en los ecosistemas debido a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y generar materia orgánica que se incorpora al suelo, lo que mejora su fertilidad y favorece la nutrición de las plantas circundantes (Prieto et al., 2013).

La utilización del mezquite es amplia entre los usos tenemos:

**Maderable:**

Su madera es dura, resistente, con un hermoso brillo al pulirla, aunque algo quebradiza y poco flexible, lo que limita su uso comercial. Se utiliza en la elaboración de muebles artesanales, destacando los trabajos de marquetería elaborados en Zacatecas, Morelos,

Guerrero, Guanajuato y Puebla. Su dureza lo hace ideal para esta actividad y le permite ser empleada en la elaboración de otros artefactos resistentes, como durmientes, parquet, duela, hormas para zapatos, mangos de herramientas y utensilios de cocina, además de utilizarse para la construcción en las zonas rurales. Se procesa en forma de brazuelos, tablas y tablones, postes para cerca, trozas en rollo (son los troncos de los árboles talados, cortados a dimensiones normalizadas, cada pieza recibe el nombre de troza, se dice que es troza en rollizo o rollo si es destinada para trituración) (Rodríguez et al., 2014; Aitim, 2011), la corteza y el corazón del tronco contiene de 6 a 7% de tanino, por lo que se aprovecha para curtir pieles (Salazar, 1998).

### **Combustible:**

Es considerado como el recurso leñoso por excelencia en las comunidades rurales, debido a su alto valor calorífico la madera se ha llamado “antracita vegetal” pues arde lentamente y mantiene bien el calor (Salazar, 1998), se utilizan las ramas como combustible casi único, para la preparación de alimentos, calentamiento de agua y hornos o para la calefacción de los hogares. Para la obtención de la leña, los campesinos necesitan desplazarse entre 1 y 7 Km (en ocasiones hasta 30 Km); sin embargo, consideran que esta forma de energía es la más barata para ellos, a pesar del gran esfuerzo humano que requiere. Otro producto combustible de gran importancia económica es el carbón, que se obtiene por calentamiento de madera en ausencia de aire. Esta labor es realizada por numerosos habitantes de zonas rurales, que encuentran en ella algún ingreso complementario (Rodríguez et al., 2014) y es de gran interés como biomasa combustible (Salazar, 1998).

### **Forraje:**

El principal producto no maderable es el fruto llamado vaina, utilizada como alimento para ganado bovino, ovino y caprino. Sus vainas dulces y semillas molidas tienen hasta un 33% de proteína. De la harina obtienen un forraje de importancia en tiempo de sequía prolongada. Del cocimiento de las semillas se obtiene melaza, el alto contenido de

sacarosa en las semillas puede crear problemas a las bacterias del rumen (Salazar, 1998). En forma de harina tiene gran demanda para la ganadería estabulada o semiestabulada con razas lecheras o de engorda, como Hereford, Angus, Aberdeen y criollos; también se suministra a otros tipos de ganado, como al porcino y al caprino y con menor intensidad, al caballar, asnal y mular. Su aprovechamiento es por medio de la recolección manual, que se lleva a cabo en los meses de julio a septiembre. Es una actividad familiar que contribuye a atenuar la precaria situación de estos campesinos, ocasionada por las pérdidas agrícolas resultantes de las sequías prolongadas, que suelen acabar con los cultivos temporaleros y los forrajes de los agostaderos. Se estima que una familia puede recolectar de 200 a 250 Kg diarios de vaina. Aunque el principal valor del mezquite como forraje radica en el fruto, es frecuente que el ganado no estabulado practique el ramoneo, que consiste en el consumo de hojas y brotes tiernos del mezquite; además, los mezquites proporcionan sombra, que es muy importante en estas regiones, debido a las elevadas temperaturas que se registran durante el día (Rodríguez et al., 2014; Bazán, 2012;).

#### **Gomas:**

Son exudados liberados cuando el árbol es herido en su corteza o en sus ramas y tiene propiedades semejantes con la goma arábica. Existen dos tipos de gomas: una es de color negro, rígida, quebradiza y astringente al gusto, con elevado contenido de taninos y se usa como colorante y la otra que es blanca o de color ambarino que se usa en medicina popular para tratar la laringitis, disolviendo la goma en agua para realizar una infusión (Cervantes et al., 2002). Las características de las gomas del mezquite cuya composición química es ácido metoxiglucurónico, galactosa y arabinosa, indican su potencial para ser utilizadas como sustituto de las gomas importadas (Rodríguez et al., 2014), para aprestar tejidos en la industria textil y se emplea como pegamento (Salazar, 1998).

**Comestible:**

Se puede obtener alcohol etílico a partir del fruto (Rodríguez et al., 2014) o también se elabora una bebida embriagante por fermentación de la harina y agua, se obtiene una especie de cerveza, la goma se usa como adulterante para fabricar dulces, pastas alimenticias, mucílagos y betunes, se obtiene en forma de lágrimas parduscas de tamaño variable, los frutos y semillas son ricas en proteínas (60%) y de sabor agradable, muy dulces (13 a 36% de sacarosa, 45 a 55% de carbohidratos) (Rodríguez et al., 2014; (Bazán, 2012), los Indios americanos secan las vainas y las muelen para convertirlas en harina, que es rica en fibra, proteína, además contiene calcio, magnesio, potasio, hierro, zinc, lisina y tiene muy poca cantidad de grasa (Bazán, 2012), también los chichimecas usaban la harina de los frutos secos para preparar tamales (mezquitamales) o mezclada con agua como bebida nutritiva (mezquiatole). Se sabe que algunos indígenas de Norte América las consumían como alimento (Salazar, 1998). Este árbol ya seco sirve como leña para calentar los pozos para preparar la barbacoa, el humo de la madera agrega un aroma distinto a la comida (Bazán, 2012).

Además, las inflorescencias son frecuentadas por gran cantidad de avispas y abejas que producen miel de gran calidad por lo tanto sostienen en buena medida la producción apícola en las regiones áridas (Rodríguez et al., 2014).

**Uso medicinal:**

En la medicina tradicional el árbol de mezquite ha sido utilizado por los pobladores del desierto desde épocas prehispánicas (Ardoino et al., 2012), entre sus usos se encuentran los siguientes:

La savia se utiliza para tratar heridas abiertas, problemas de la piel como quemaduras así como preparar un consomé para suavizar la garganta irritada (Bazán, 2012)

Contiene elementos que ayudan a estabilizar los niveles de glucosa en la sangre, puesto que sus azúcares consisten en fructosa y no requieren de insulina para utilizarlos y

gracias a sus fibras solubles como la goma galactomanina (requiere de 4 a 6 horas para digerirse) (Bazán, 2012).

Algunos metabolitos presentes en *Prosopis* son quercetina, serotonina (antidepresivo), apigenina (antialérgico, antibacterial, antiviral y antiinflamatorio), isorhamnetina 3-diglicósido (defensa del hígado), L-arabinosa (excelente fuente de azúcar) y triptamina (combate amibas) (Bazán, 2012; Flores, 2011).

La savia del mezquite se usa como gotas para los ojos (Bazán, 2012) al igual que el cocimiento de las hojas por diferentes métodos como moler las hojas en agua hervida, aplicándose en gotas, haciendo lavados o aplicando compresas con las hojas colocándolas sobre los ojos, esto se aplica 2 o 3 veces al día, se utiliza para varias afecciones de los ojos como: la irritación, cuando se está perdiendo la vista, comezón, hinchazón y para curar las nubes de los ojos (Bazán, 2012; Mata, 2009; Flores, 2011; CONAFOR, 2015).

El cocimiento de la corteza es utilizado como vomitivo, purgante o para quitar las manchas de la cara: se mastica un pedazo de la parte interna blanca de la cáscara por tres días o se cuece y se toman 3 vasos al día, para que se limpie el estómago, para provocar el vómito se mastica una hoja y se chupa el “juguito” (Bazán, 2012; Canales et al., 2006; Mata, 2009; Salazar, 1998).

Para infecciones del estómago, diarrea, empacho, antiácido, antiemético y mala digestión: se hierven dos pedazos de 10 cm de cáscara verde en medio litro de agua, en un jarro de barro y se toma como té, tres veces al día o antes de cada comida (Mata, 2009; Flores, 2011; Moore, 1989).

Es una buena medicina para la disentería: se pone a hervir la cáscara o las hojas en un jarro de barro con medio litro de agua y se toma (Mata, 2009; Bazán, 2012).

Para el cólico intestinal: la cáscara interna se mastica y se traga la saliva (Mata, 2009).

Se toma la cocción de las hojas en caso de “mal de orín” (Flores, 2011) y se le da en forma de té para las parturientas (Canales et al., 2006).

Para cualquier clase de ponzoña: la cáscara externa seca se cuece en 1 litro de agua tomándola (Mata, 2009; Flores, 2011).

Se utiliza para cuando no brota el sarampión: la hoja se muele y se da a tomar al enfermo, se machaca primero, luego se pone en agua y se cuela en un trapo (Mata, 2009; Flores, 2011).

Se utiliza para la hemorragia, dolor de cabeza, asma y para personas tísicas; se cuece la cáscara y se toma tres veces al día o hasta que se sienta bien la persona. La cáscara se machuca y se amarra a la cabeza para evitar el dolor (Mata, 2009).

Para dolor de muela: la parte blanca de adentro de la cáscara, se machaca y se pone un pedazo en la muela picada como tapón (Mata, 2009; Flores, 2011).

Para la fiebre: las ramitas verdes se refriegan en agua y se toma como agua de uso (se puede agregar un punto de sal).

El azufre o goma que le escurre al árbol se unta en el ombligo de los niños que se orinan en la noche, también se usa en el tratamiento de quemaduras, heridas, llagas en los dedos agrietados, labios y quemaduras de sol (Flores, 2011; Mata, 2009).

Para el tratamiento de los golpes: se muelen las hojas o la cáscara del tallo y se untan sobre la parte afectada (Mata, 2009).

Cuando está triste porque se murió algún pariente, se va a un entierro o a un velorio, se sahuma por tres días con mezquite, hojas de romerillo, gocoyaqui, cáscara de naranja y maíz (Mata, 2009).

Para curar el “mal de ojo”: se cuecen las hojas o el tallo y se moja un trapito limpio con el agua, éste se coloca sobre los ojos. La curación se debe hacer dos o tres veces al día. (Mata, 2009).

Para las limpias del “mal aire”: se juntan siete hierbas, mezquite, pirul, marrubio, flor de ratones, danicatze y casucuché y se limpia con estas hierbas y un huevo de gallina de rancho (Mata, 2009).

Para las personas “asustadizas”: se utiliza el corazón del palo se corta en pedazos y se pone a las brasas hasta que agarre lumbre y antes de que haga cenizas o desbarate se pone en un balde de agua y se toma como agua de uso (Mata, 2009).

Se usa también en caso de quemaduras de sol, en caso de infecciones en la garganta, como una cataplasma o como una bebida para las picaduras de insectos (Flores, 2011).

Para las personas con el empacho del intestino se toma un cuadrito de lo blanco de la cáscara para cortar la diarrea, se machacan y se cuecen en medio litro de agua para tres tomas al día (Flores, 2011).

### **Apicultura:**

El néctar es valioso para la producción de miel de alta calidad. Las flores de la variedad glandulosa producen una miel excelente. El árbol produce suficiente néctar para obtener un kilo de miel por año a partir del néctar de cada planta de mezquite, para un total de 100 a 400 kg de miel por hectárea por año (Salazar, 1998; CONAZA, 1994).

Con respecto a las flores, se tiene documentado que contienen cantidades considerables de néctar y polen, por lo cual son visitadas por las abejas, de tal forma que las flores de *P. laevigata* son consideradas muy importantes en la apicultura (Cervantes et al., 2002).

## ANTECEDENTES

En la comunidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla se ha realizado un trabajo sobre la flora útil (Rosas, 2003) en el cual *P. laevigata* destaca como una de las especies de importancia económica pues es de múltiples usos.

Canales et al. (2006) reportan que *P. laevigata* se utiliza en la comunidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla la corteza de la raíz en cocción para curar heridas, así como vomitivo, purgante y té para parturientas.

Rodríguez et al. (2014) reportan que de las hojas de *P. juliflora* se han aislado los alcaloides juliflorina, julifloricina y julifloridina que poseen actividad antimicrobiana.

INECOL (2007) reporta que sus extractos en alcohol de las hojas frescas y maduras han mostrado una marcada acción antibacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Gómez et al. (2014) trabajaron con extractos metanólicos de plantas de la familia *Fabaceae* con el cual obtuvieron marcada actividad en cepas como *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*.

Toso et al. (2012) probaron los efectos que producen distintos extractos de diferentes partes de *Prosopis flexuosa* DC. Var. *flexuosa* (partes aéreas, corteza y frutos) sobre el tránsito intestinal en ratones.

Aqeel et al. (1989) mostró que los extractos de *Prosopis juliflora*, tienen actividad inhibitoria contra de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus*.

García et al. (2006), probaron 32 extractos de plantas medicinales comúnmente utilizadas en México, de las cuales el extracto etanólico de *Acacia farnesiana* (familia

Fabaceae) inhibió efectivamente el crecimiento de 2 cepas de *V. cholerae*, presentando CMB's de entre 4-7 mg/mL dependiendo de la cepa probada.

Salud-Pérez et al. (2007) determinaron la actividad antimicrobiana de extractos clorofórmicos, metanólicos y acuosos de la corteza de 3 árboles de la familia *Fabaceae*, *Gliricidia sepium*, *Lysiloma divaricata*, *Lysoma tergemina* contra *S. lutea*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *S. choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. pumillus*, *S. typhimurium*, *P. vulgaris*, *V. cholerae* y *C. albicans*. Los resultados indican que los extractos metanólicos de las especies de *Lysiloma* y de *G. sepium*, presentaron actividad antimicrobiana contra, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. pumillus*, y *V. cholerae*.

Geetha et al. (2011) realizaron extractos etanólicos y acuosos de *Acacia catechu* (familia *Fabaceae*), para evaluarlos contra *S. typhi*, *S. flexneri*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*, los resultados mostraron que todas las concentraciones evaluadas (100, 150 y 200 µg/mL) de los extractos acuosos y etanólicos fueron efectivos para inhibir el crecimiento de todas las cepas probadas.

Sánchez (2012) evaluó el efecto de extractos de plantas sobre la actividad antibacteriana demostrando que los extractos metanólicos de mezquite y huizache mostraron inhibición de 16 a 25 mm.

Gallegos et al. (2013) obtuvieron un pinole de alta calidad funcional a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*) y determinaron los fenoles y la actividad antioxidante.

Corzo et al. (2009) evaluaron la actividad antibacteriana de la infusión y de la decocción de las hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a las siguientes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC (29213), *Enterococcus faecalis* (IEV208) y *Enterococcus faecium* (IEV229), *Escherichia coli* (301), *Proteus mirabilis* (304), *Pseudomonas aeruginosa* (305) y *Klebsiella pneumoniae* (310). Además emplearon dos cepas fitopatógenas:

*Pseudomonas corrugata* y *Agrobacterium tumefaciens*, obteniendo que la infusión de las hojas de *Prosopis alba* no inhibe el crecimiento de las cepas estudiadas, pero si lo disminuye considerablemente hasta la concentración 316 µg/mL.

Ardoino et al. (2012) utilizó el extracto de *Prosopis flexuosa* sobre *Brucella canis* el cual mostró actividad bactericida.

Ardoino et al. (2013) realizaron la caracterización fitoquímica de hojas de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (Algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), durante la marcha fitoquímica se determinó la presencia de flavonoides, grupos esteroidales y triterpenos, alcaloides y aminogrupos en ambas especies vegetales. En *Prosopis flexuosa* var. *depressa* no se detectaron taninos y si en *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*. En la detección de saponinas se observó que *Prosopis flexuosa* var. *depressa* demostró menor poder tensoactivo y mayor poder emulsificante que *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*.

Zamacona et al. (2010) realizaron diferentes pruebas de identificación y caracterización para comprobar la presencia de alcaloides en dos diferentes variedades de mezquite *Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida*, se compararon los extractos acuosos y etanólicos en diferentes concentraciones de las hojas y de los frutos de ambas variedades de mezquite y se encontró una diferencia en la concentración de alcaloides entre variedades de *Prosopis*, y se formuló una forma farmacéutica del extracto de mezquite.

Martínez et al. (2011) determinaron la actividad antibacteriana de *Bauhinia variegata* (familia *Fabaceae*) así como la presencia de flavonoides con propiedades antidiabéticas y antivirales.

Gómez et al. (2014) estudiaron extractos metanólicos de seis plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae*, *Albizia adinocephala* (J.D.Sm.) Britt. & Rose, *Dalbergia brownei* (Jacq.) Schinz, *Diplotropis purpurea* (Rich.) Amshoff, *Machaerium* sp., *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. en busca de propiedades antimicrobianas.

Mata et al. (2009) compila varios trabajos sobre *P. juliflora* mostrando que las hojas contienen los alcaloides julifloridina y juliprosopina, el alcaloide del indol triptamina, y el ses-quiterpeno prosopidiona. De la corteza del tallo se han aislado los flavonoides 8-hidroxi-4'-metoxi-7-neohesperidósido de iso-flavona, 4 metil-éter-betagalactopiranosido de camferol, alfa-ramnósido de leucodelfinidín y el glucosil-ramnósido y ombuín. Del fruto se han aislado los flavonoides camferol, glucopiranosido de leucocianidín y glucopiranosil-ramnopiranosido de delfinidín; y la cumarina pentaglicosilada del ácido dimetil-elágico. En la raíz se han detectado los flavonoides galactopiranosidos de 3'-4'-dihidroxi-5-metoxi-6-metil-flavonona y 4-7-dimetoxi-6-8-metil-flavonona. En la planta se han detectado los alcaloides de indolizidina juliprosina y el iso-componente. En la semilla la cumarina 4-ramnosil-gentiobiósido del ácido elágico. La actividad antibiótica de esta planta ha sido bien demostrada con una fracción de alcaloides obtenida de las hojas. Se ha obtenido respuesta positiva frente a 17 cepas diferentes de bacterias, observándose mayor actividad contra *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*. Esta misma fracción alcaloidea presentó actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Un extracto etanólico-acuoso preparado de las partes aéreas de la planta presentó actividad antiespasmódica evaluada en íleon de cobayo y actividad diurética en ratas por la vía intraperitoneal a la dosis de 0.187 mg/Kg.

Tomando en cuenta los antecedentes antes mencionados, se plantea el siguiente problema

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿El extracto metanólico de la flor del mezquite tendrá actividad antibacterial?

## **HIPÓTESIS**

Si *P. laevigata* se utiliza en la medicina tradicional para aliviar diferentes padecimientos y si se ha demostrado que especies del género *Prosopis* tienen actividad antibacterial, entonces es posible que el extracto metanólico de la flor del mezquite tenga actividad antibacteriana contra cepas que infectan al hombre.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de la flor del mezquite *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst.

### OBJETIVOS PARTICULARES

De la flor del mezquite:

1. Determinar cualitativamente la actividad antibacteriana por medio del método de difusión en agar.
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por medio del método de dilución en caldo en las cepas sensibles al extracto metanólico.
3. Determinar la actividad bacteriostática o bactericida en las cepas más sensibles al extracto metanólico en una curva de crecimiento bacteriano.
4. Determinar la toxicidad general del extracto usando el modelo de *Artemia salina*
5. Cuantificar la cantidad de fenoles totales a partir del método de Singleton.
6. Cuantificar la cantidad de flavonoides mediante el método de Dowd
7. Determinar la capacidad antioxidante media (DPPH).
8. Evaluación cuantitativa de alcaloides
9. Cuantificar xantofilas totales por espectrofotometría
10. Cuantificar la proporción de xantofilas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).
11. Caracterizar fitoquímicamente el extracto usando una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-EM).

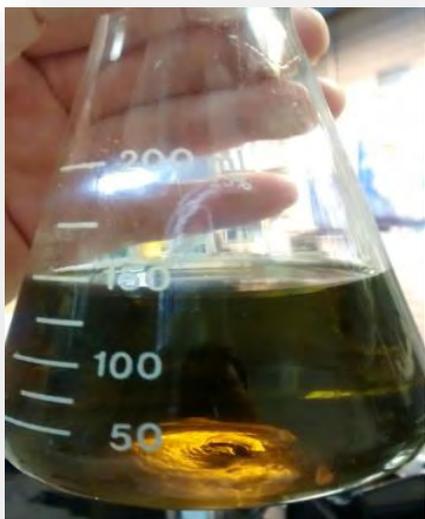
## Material y Métodos

### Colecta de material

La colecta del material de estudio se realizó en Febrero de 2015 en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán-Cuicatlán, Reserva de la Biosfera (Apéndice 2).

### Obtención del extracto metanólico

La obtención del extracto se llevó a cabo por el método de maceración (Domínguez, 1973). Las flores colectadas se pesaron (27.27 g) y colocaron en un matraz con metanol, para posteriormente obtener el extracto metanólico crudo, el cual se filtró (Figura 1) y fue destilado a presión reducida en un rotavapor (Figura 2). El rendimiento del extracto se determinó con relación al peso seco de la planta.



**Figura 2.** Destilación del extracto metanólico crudo en el rotavapor.

## Pruebas biológicas

### Evaluación de la actividad antibacteriana

Se utilizaron diecinueve cepas bacterianas (seis Gram positivas y trece Gram negativas) de importancia médica:

**Cuadro 1.** Cepas de bacterias evaluadas en la prueba cualitativa.

Tipo	Cepa	Clasificación, serotipo o donadas por:
Gram positiva	<i>Streptococcus mutans</i>	CDBB-B-1455 CINVESTAV
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12398 Laboratorio Análisis Clínicos FESI
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 meticilina resistente
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33592 Laboratorio Análisis Clínicos FESI
	<i>Staphylococcus aureus</i>	85 S meticilina resistente
	<i>Enterobacter faecalis</i>	CDBB-B-1533 CINVESTAV
Gram negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDBB-B-999 CINVESTAV
	<i>Escherichia coli</i>	Laboratorio Análisis Clínicos FESI Caso Clínico 1
	<i>Escherichia coli</i>	Laboratorio Análisis Clínicos FESI Caso Clínico 2
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDBB-B958 CINVESTAV
	<i>Enterobacter cloacae</i>	FES Cuautitlán
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDBB-B968 CINVESTAV
	<i>Proteus mirabilis</i>	Caso Clínico Hospital Los Ángeles
	<i>Vibrio cholera</i>	Caso Clínico
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V 12 (El Tor)
	<i>Salmonella typhimurum</i>	FES Cuautitlán
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDBB-1159 CINVESTAV
	<i>Salmonella typhi</i>	CDBB-B-1111 CINVESTAV

### **Evaluación cualitativa**

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, se llevó a cabo de acuerdo con el método de difusión en agar de Kirby-Baüer, en el cual los discos fueron impregnados con 2 mg y 4 mg del extracto; como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo sensidiscos con 10 µL del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945) (Apéndice 3).

### **Evaluación cuantitativa**

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las cepas sensibles al extractos por la microtécnica de dilución en caldo, con concentraciones de: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg/mL. Las cajas fueron inoculadas con 50 µL de cultivo bacteriano a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL durante 24 horas (Koneman et al., 1985) (Apéndice 4).

### **Efecto del extracto de la flor de mezquite sobre la curva de crecimiento bacteriano**

Se evaluó el efecto del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano, utilizando una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa. Se monitoreó el crecimiento en nueve tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto ( $\frac{1}{2}$  CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Muroi et al., 1993) (Apéndice 5).

### **Toxicidad general del extracto usando el modelo de *Artemia salina***

El ensayo se realizó con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Método modificado de Niño et al., 2006), para evaluar la toxicidad de los compuestos contenidos en el extracto de la

flor de mezquite (Apéndice 6), las concentraciones del problema a ensayar fueron: 25 mg/mL, 12.5 mg/mL y 1.25 mg/mL o 10, 100 y 1000 ppm respectivamente, en frascos viales por triplicado. Se colocaron en los frascos viales 10 larvas y se dejaron expuestas con los compuestos del extracto durante 24 horas, se registró el número de organismos vivos inicialmente (OV) y organismos muertos (OM) y se calculó el porcentaje de letalidad por cada concentración mediante la siguiente ecuación:  $\% \text{Letalidad} = \text{OM} / \text{OV} \times 100$ , con el resultado se clasificó el extracto de la flor según el Criterio del Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (Pinzón et al., 1995).

### Pruebas químicas

#### Contenido de fenoles totales (CFT)

Para el contenido de fenoles totales se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu (Apéndice 7). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las concentraciones: 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.1, 0.2 mg/mL. Las concentraciones que se utilizaron para el extracto fueron de 0.05 mg/mL y 0.1 mg/mL, las absorbancias se interpolaron con la curva de calibración del ácido gálico (Método modificado de Singleton et al., 1999).

#### Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método de Dowd (Apéndice 8) empleando una solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2%. Se realizó una curva patrón de quercetina a diferentes concentraciones (1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y una concentración del extracto de 3 mg en 3 mL de metanol sin  $\text{AlCl}_3$ . Se determinó la absorbancia a 415 nm, los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  equivalentes de Quercetina por gramo de extracto de flor de mezquite ( $\mu\text{g eQ}/\text{g}$ ).

### **Evaluación de la capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante fue evaluada con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Para la determinación de la Capacidad Antioxidante Media (CA<sub>50</sub>), se utilizaron las siguientes concentraciones: 1, 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm. Como control positivo se utilizó quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema y como blanco se utilizaron pozos con 200 µL de MeOH grado HPLC (Okusa et al., 2007) (Apéndice 9).

### **Evaluación cuantitativa de alcaloides**

La prueba fitoquímica se realizó de acuerdo con los métodos estándar, para la detección de alcaloides se colocó un poco de extracto en 2 tubos de ensaye y se le agregó ácido clorhídrico al 5%, posteriormente a cada tubo se le agregó reactivo de Mayer y reactivo de Dragendorff. La formación de precipitado blanco o amarillo claro y la formación de precipitado rojo-naranja indica la presencia de alcaloides respectivamente (Apéndice 10).

### **Cuantificación de xantofilas totales por espectrofotometría**

Este método se utilizó para la cuantificación de la proporción de xantofilas totales en pigmentos, la extracción se basó en la saponificación de los pigmentos con una disolución extractora HEAT (Hexano: Etanol: Acetona: Tolueno (10:6:7:7)) y se determinó la absorbancia de la epifase a 474 nm, posteriormente se aplica una fórmula (Apéndice 11) y el resultado se expresa como gramos de xantofilas totales por kilogramos de muestra (g XT/Kg M).

### **Perfil de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

Este método se utilizó para la cuantificación de la proporción de xantofilas totales en pigmentos, la separación se basó en la migración diferencial debida a la polaridad de la molécula y la detección por la absorbancia de la molécula, se empleo una columna Allsphere ODS-1-5 u leght 250 mm con el método de pigmentos, corriendo la muestra con dos fases: disolvente A: Acetronilo: Metanol: Tris-HCl 0.1 M pH 8 (72:8:3), disolvente B: Metanol: Hexano (40:10) en un tiempo de 15 minutos (Apéndice 12).

### **Caracterización fitoquímica del extracto**

#### **Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)**

Se inyectaron 30 µL del extracto metanólico, se empleó una columna RTX 30m con el método estandarizado para flavonoides corriendo el extracto con hexano en un tiempo de 29 minutos (Apéndice 13).

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

Se inyectaron 30 µL del extracto metanólico, se empleó una columna Lichospher RP-18 con el método estandarizado para flavonoides a una temperatura de 22°C-23°C corriendo el extracto con una mezcla de MeOH: acetonitrilo: ácido fosfórico: H<sub>2</sub>O (25:25:0.1:50), en un tiempo de 20 minutos (Apéndice 14).

#### **Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM)**

Se inyectó el extracto, se empleo una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150x2.1 mm) (Phenomenex) y una fase móvil y una fase móvil A de ácido acético alo.025% y fase B de metanol, iniciando en proporción 50:50 con un flujo de 0.15 mL/min e iniciando con un gradiente de 0 a 65 min hasta llegar al 100%. (Apéndice 15).

## Análisis estadístico

A los resultados de la actividad antibacteriana, se les realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos en las pruebas cualitativas. Los resultados obtenidos de los halos de inhibición por cepa bacteriana y concentración fueron analizados con las medidas descriptivas: mediana, media, desviación estándar, cuartil 1 ( $Q_1$ ), cuartil 3 ( $Q_3$ ), mínimo y máximo. Así mismo se elaboraron diagramas de caja por cepa bacteriana y por cepa con la concentración.

Para determinar si había diferencias significativas entre las diferentes capas bacterianas y las concentraciones, se realizó un análisis de varianza factorial donde los factores a considerar fueron concentración y cepa bacteriana.

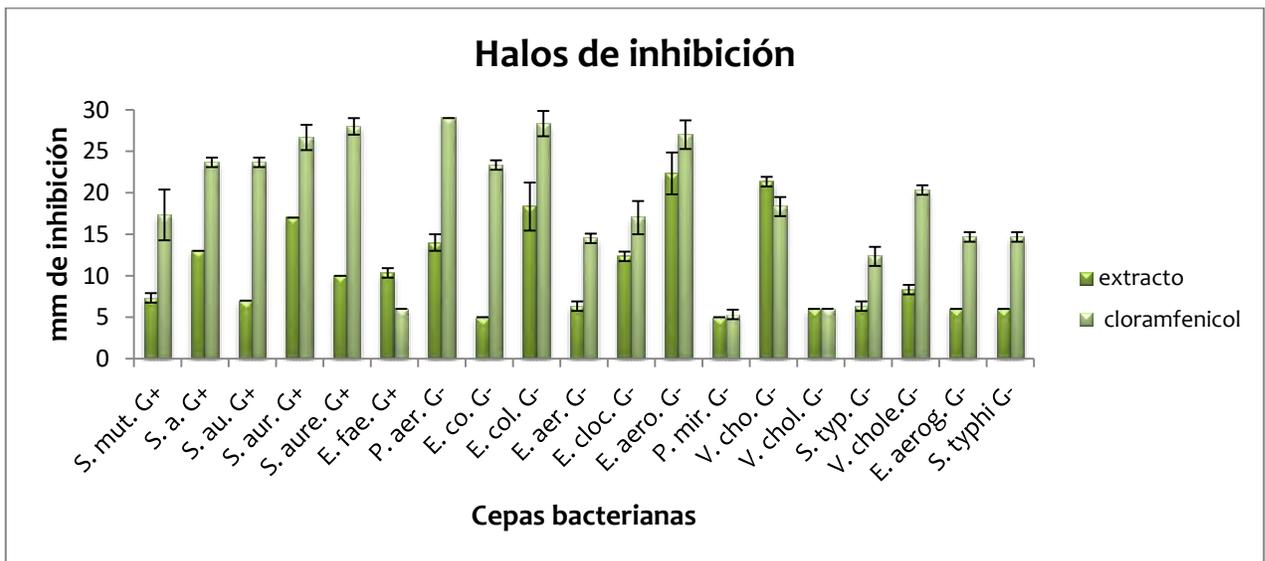
## RESULTADOS

### Rendimiento del extracto metanólico

Se colectaron 27.27 g de flor (peso seco), del cual se obtuvo 5.17 g de extracto metanólico con un rendimiento de 18.95%.

### Evaluación cualitativa

Se obtuvieron los halos de inhibición que presentaron las cepas Gram positivas y las cepas Gram negativas frente al extracto de la flor de mezquite *Prosopis laevigata*, se muestran a continuación en la figura 3 y cuadro 2 siguientes:

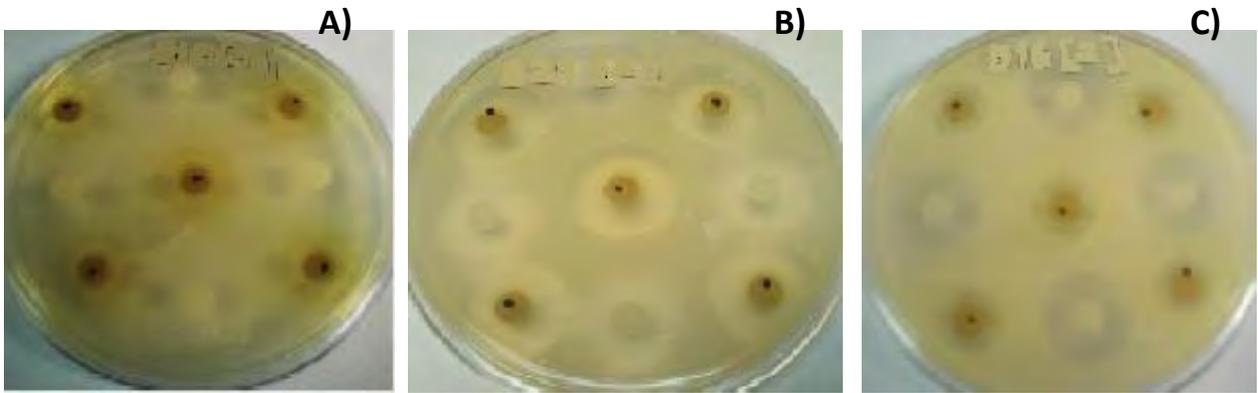


**Figura 3.** Gráfico de los halos de inhibición de *P. laevigata* y el control positivo *Cloramfenicol* sobre bacterias Gram positivas y negativas

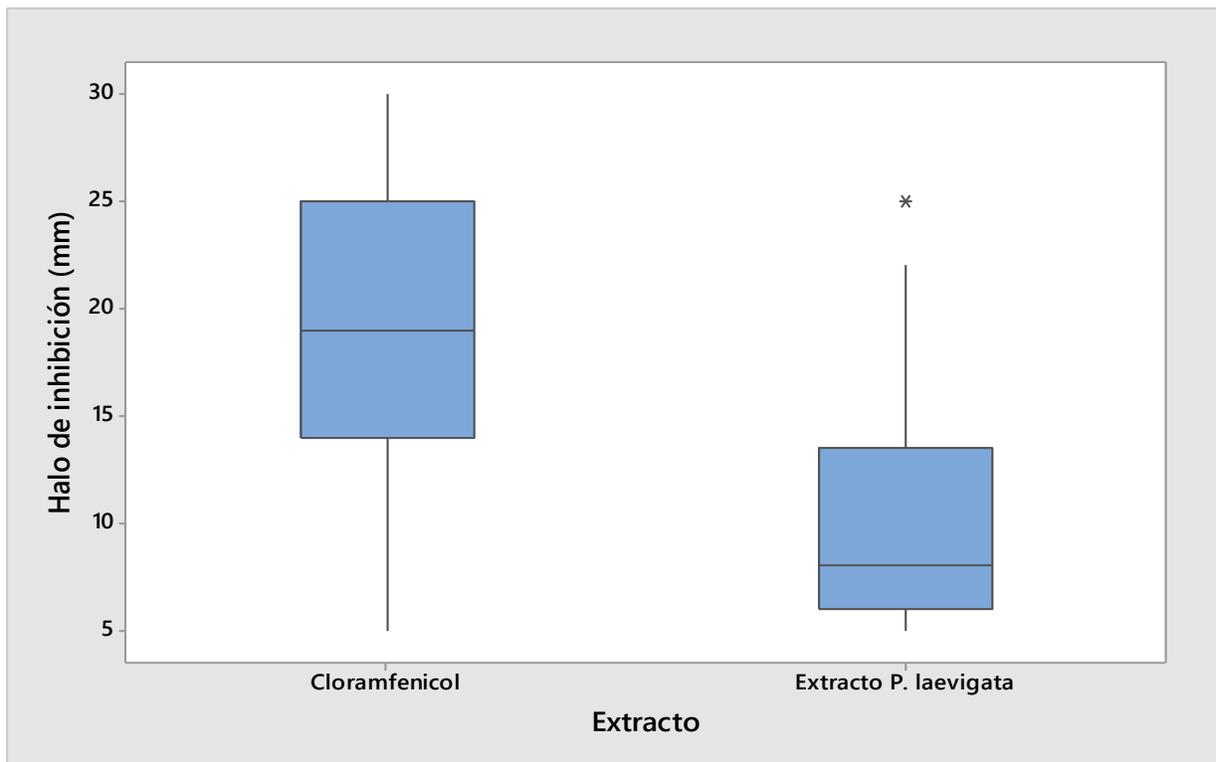
En la figura 3 y Cuadro 2 se observa que el extracto de *P. laevigata* mostró actividad inhibitoria al igual que el control positivo cloramfenicol aunque este presento mayores halos de inhibición en la mayoría de las cepas probadas.

**Cuadro 2.** Halos de inhibición de *P.laevigata* y de Cloramfenicol.

Tipo	Cepa	Clasificación, serotipo o donadas por:	Extracto (mm)	Cloramfenicol (mm)
Gram positiva	<i>Streptococcus mutans</i>	CDBB-B-1455 CINVESTAV	7.33 ± 0.58	17.33 ± 3.05
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12398 Laboratorio Análisis Clínicos FESI	13.00 ± 0.00	23.66 ± 0.57
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 meticilina resistente	7.00 ± 0.00	23.66 ± 0.57
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33592 Laboratorio Análisis Clínicos FESI	17.00 ± 0.00	26.66 ± 1.52
	<i>Staphylococcus aureus</i>	85 S meticilina resistente	10.00 ± 0.00	28.00 ± 1.00
	<i>Enterobacter faecalis</i>	CDBB-B-1533 CINVESTAV	10.20 ± 0.44	6.00 ± 0.00
Gram negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDBB-B-999 CINVESTAV	14.00 ± 1.00	29.00 ± 0.00
	<i>Escherichia coli</i>	Laboratorio Análisis Clínicos FESI Caso Clínico 1	5.00 ± 0.00	23.33 ± 0.57
	<i>Escherichia coli</i>	Laboratorio Análisis Clínicos FESI Caso Clínico 2	18.33 ± 2.88	28.33 ± 1.52
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDBB-B958 CINVESTAV	6.20 ± 0.44	15.50 ± 1.29
	<i>Enterobacter cloacae</i>	FES Cuautitlán	12.20 ± 0.44	17.50 ± 1.91
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDBB-B968 CINVESTAV	21.40 ± 2.19	26.50 ± 1.73
	<i>Proteus mirabilis</i>	Caso Clínico Hospital Los Ángeles	5.00 ± 0.00	5.25 ± 0.50
	<i>Vibrio cholera</i>	Caso Clínico	21.00 ± 0.70	18.25 ± 0.95
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V 12 (El Tor)	6.00 ± 0.00	5.75 ± 0.50
	<i>Salmonella typhimurum</i>	FES Cuautitlán	6.20 ± 0.44	11.75 ± 1.50
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDBB-1159 CINVESTAV	8.20 ± 0.44	20.00 ± 0.81
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CDBB-B968 CINVESTAV	6.00 ± 0.00	14.25 ± 0.95
	<i>Salmonella typhi</i>	CDBB-B-1111 CINVESTAV	6.00 ± 0.00	14.50 ± 0.57



**Figura 4.** Halos de inhibición de *P. laevigata* (sensidiscos amarillos) y el control positivo Cloramfenicol (sensidiscos blanco) en A) se puede observar que los halos de inhibición son del mismo tamaño, mientras que en B) son mayores los de *P. laevigata* y en C) los halos de cloramfenicol son mayores que los de *P. laevigata*.



**Figura 5.** Diagrama de caja de la longitud promedio de los halos de inhibición de cloramfenicol y *P. laevigata*.

Como se puede observar en la figura 5, los mayores halos de inhibición los presentaron las cepas frente al cloramfenicol, presentó una mediana de 19 mm, mientras que el extracto metanólico de *P. laevigata* presentó inhibición en las cepas con una mediana de



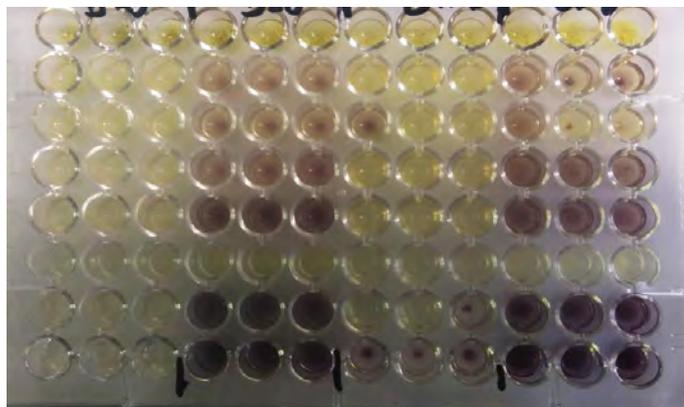
## Evaluación cuantitativa

Los resultados de la prueba cuantitativa muestran que entre las cepas más sensibles al extracto fueron: *S. aureus* ATCC 33592 y *V. cholerae* CDBB-B 1159 con los valores de CMI y CBM (0.312 mg/mL y 0.625 mg/mL; 0.625 mg/mL y 1.25 mg/mL respectivamente) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Cepa	CMI mg/mL	CBM mg/mL
<i>Streptococcus mutans</i> CDBB-B 1455	-----	-----
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	2.5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2.5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592 FESI	0.312	0.625
<i>Staphylococcus aureus</i> 85S met resistente	0.312	0.625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B 999	0.312	0.625
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B 958	5	2.5
<i>Enterobacter cloacae</i> FESC	0.312	0.625
<i>Escherichia coli</i> FESI Caso Clínico 1	0.312	1.25
<i>Escherichia coli</i> FESI Caso Clínico 2	0.312	1.25
<i>Proteus mirabilis</i> H. L. A.	2.5	20
<i>Vibrio cholera</i> Caso Clínico	0.312	1.25
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12 (El Tor)	-----	-----
<i>Salmonella typhimurum</i> FESC	10	20
<i>Vibrio cholerae</i> CDBB B 1159	0.625	1.25
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB B 968	2.5	20
<i>Salmonella typhi</i> CDBB B 1111	1.25	5

Como se puede observar en el Cuadro 3 la mayoría de las cepas presentaron CMI con valores de 0.312 mg/mL y para CBM de 0.612 mg/mL, de este ensayo se eligieron dos bacterias una Gram positiva *S. aureus* ATCC 33592 y Gram negativa *V. cholerae* CDBB-B 1159, para el ensayo de crecimiento bacteriano, estas presentaron valores de CMI de 0.312 mg/mL y 0.625mg/mL mientras que los valores de CBM fueron de 0.625 mg/mL y 1.25mg/mL respectivamente.

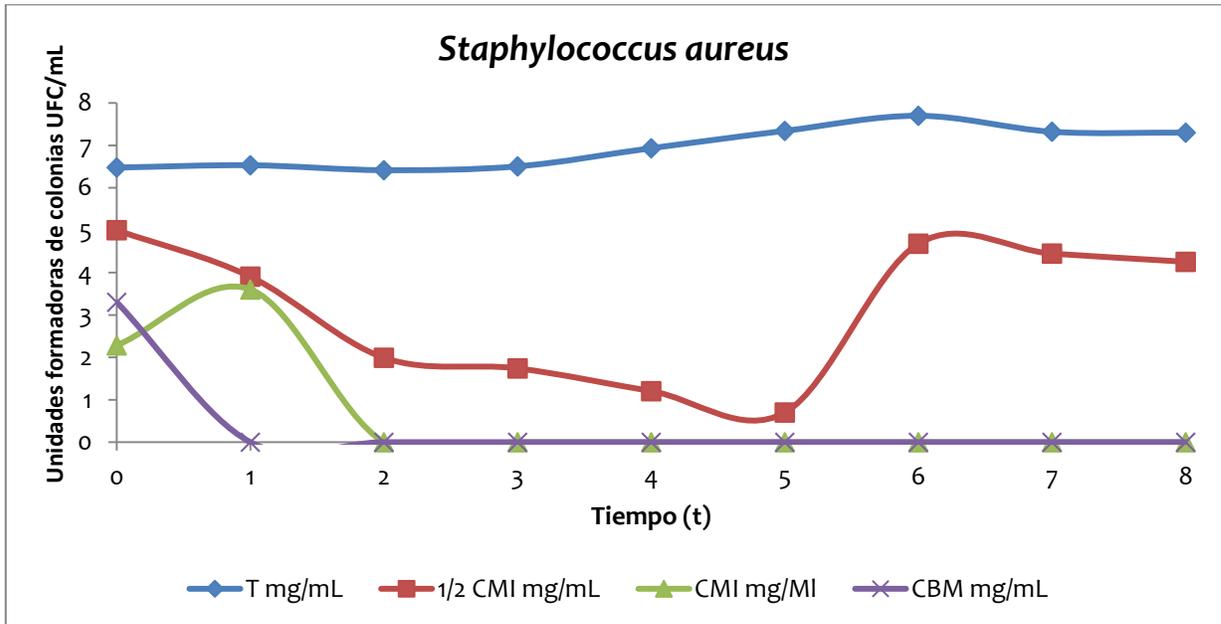


**Figura 7.** Actividad del extracto de *P. laevigata* sobre algunas cepas bacterianas durante el ensayo de CMI y CBM.

#### **Actividad del extracto en la curva de crecimiento bacteriano**

Las cepas bacterianas tipo Gram positiva y Gram negativa que se eligieron fueron *Staphylococcus aureus* ATCC33592 y *Vibrio cholerae* CDBB-B 1159, por lo tanto se estudió la actividad del extracto de *Prosopis laevigata* sobre la curva de crecimiento bacteriano, se observó una un comportamiento bactericida en ambas cepas.

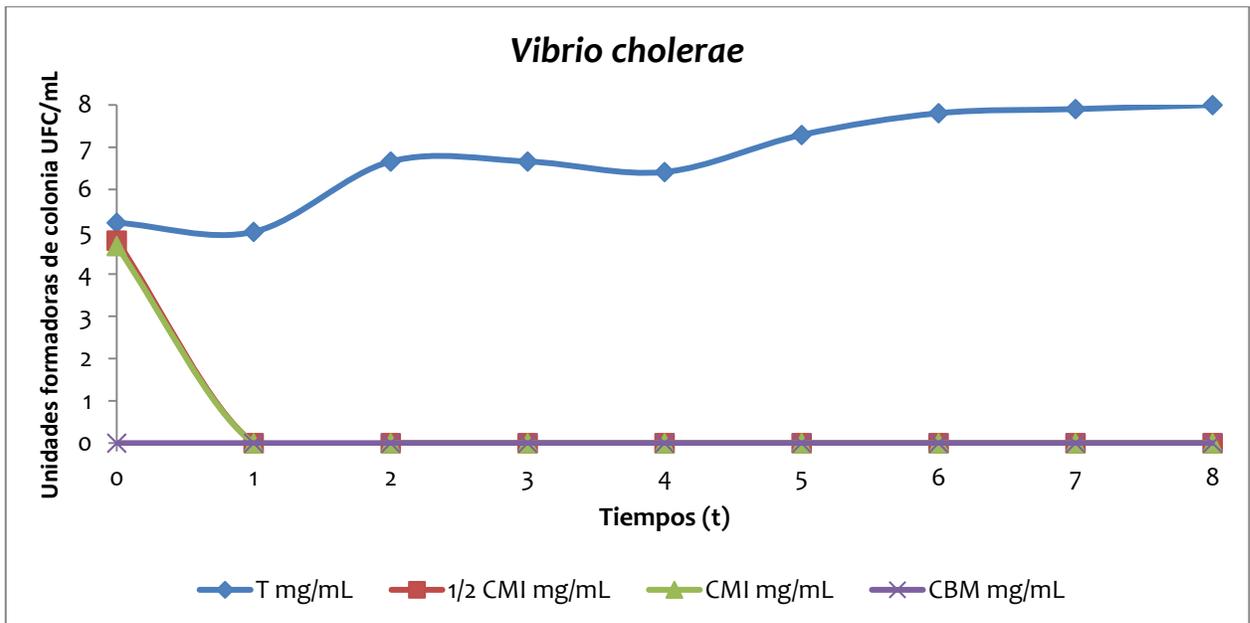
## Gram positiva



**Figura 8.** Actividad del extracto metanólico de *P. laevigata* sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

El extracto de *P. laevigata* tuvo una actividad bactericida sobre *Staphylococcus aureus* a partir del primer tiempo en CMI y CBM, manteniéndose así durante los 8 tiempos siguientes mientras que en 1/2 CMI durante los tiempos 0 a 5 se observa un descenso en la población bacteriana, sin embargo en los 3 tiempos siguientes aumenta el número de sobrevivientes, pero es muy importante mencionar que se modificó la morfología de las colonias pues en estos últimos tiempos las colonias eran cada vez de menor tamaño.

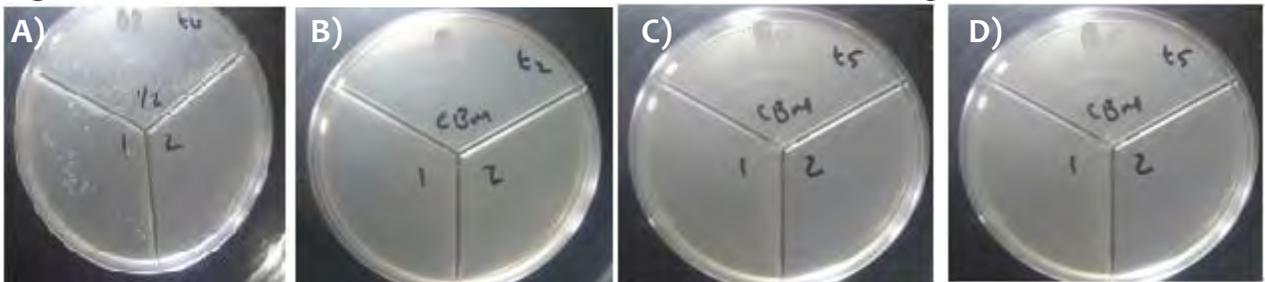
## Gram negativa



**Figura 9.** Actividad del extracto metanólico de *P. laevigata* sobre la curva de crecimiento de *Vibrio cholerae*.

La cepa *Vibrio cholerae* mostró un comportamiento bactericida, a partir del primero tiempo tanto en 1/2CMI, CMI y CBM y siguió así hasta el tiempo ocho, mientras que el testigo fue en aumento, en un crecimiento esperado

**Figura 10.** Se muestra la actividad del extracto metanólico de *P. laevigata* sobre la curva



de crecimiento bacteriano en A) al tiempo 0 hubo poco crecimiento bacteriano y C) al tiempo 5 ya no hubo crecimiento ambas pertenecen a *S. aureus* mientras que B) al tiempo 2 ya no hubo crecimiento bacteriano y en D) al tiempo 5 continuo con el mismo comportamiento estas pertenecen a *V. cholerae*.

## Toxicidad general

La evaluación de toxicidad general, se realizó con el extracto de *P. laevigata* sobre larvas nauplio II de *Artemia salina*, en el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos, observando un alto porcentaje de mortalidad.

**Cuadro 4.** Porcentaje de letalidad de *Artemia salina* sobre el extracto de *P. laevigata*.

Muestra	[c] ppm	% de Letalidad
<i>Prosopis laevigata</i>	1000	100
	100	96
	10	90

### Contenido de Fenoles Totales

Se determinó el contenido de fenoles totales del extracto de flor de mezquite debido a que estos tienen propiedades bactericidas y antifúngica (Varas, 2004) por mencionar algunas, el extracto posee 61.29 mg e AG/g lo que equivale al 1.185% del peso total del extracto. La curva patrón de ácido gálico para la obtención del contenido de fenoles totales del extracto de flor de mezquite se muestra en el apéndice 7.

### Contenido de Flavonoides Totales

Se obtuvo el contenido total de flavonoides por medio de una curva patrón de quercetina (apéndice 8) y encontrándose un total de 3.64 µg (eQ)/g, lo que representa el 0.00007% del peso total del extracto de flor de mezquite.

### Actividad antioxidante del extracto

La Capacidad Antioxidante media ( $CA_{50}$ ) del extracto de *P. laevigata*, fue de 591.38  $\mu\text{g/mL}$ , obtenida a partir de la reducción en un 50% del radical DPPH (apéndice 9), siendo importante mencionar que la técnica se modificó pues a 100 ppm no se observó capacidad antioxidante sino hasta las 1000 ppm se mostro dicha capacidad y como control positivo se utilizó quercetina.

### Evaluación cualitativa de alcaloides

En la prueba de alcaloides se realizó con 2 reactivos Dragendorff el cual no mostro presencia, mientras que con el reactivo de Mayer si mostro presencia presentando una coloración amarilla verdosa.



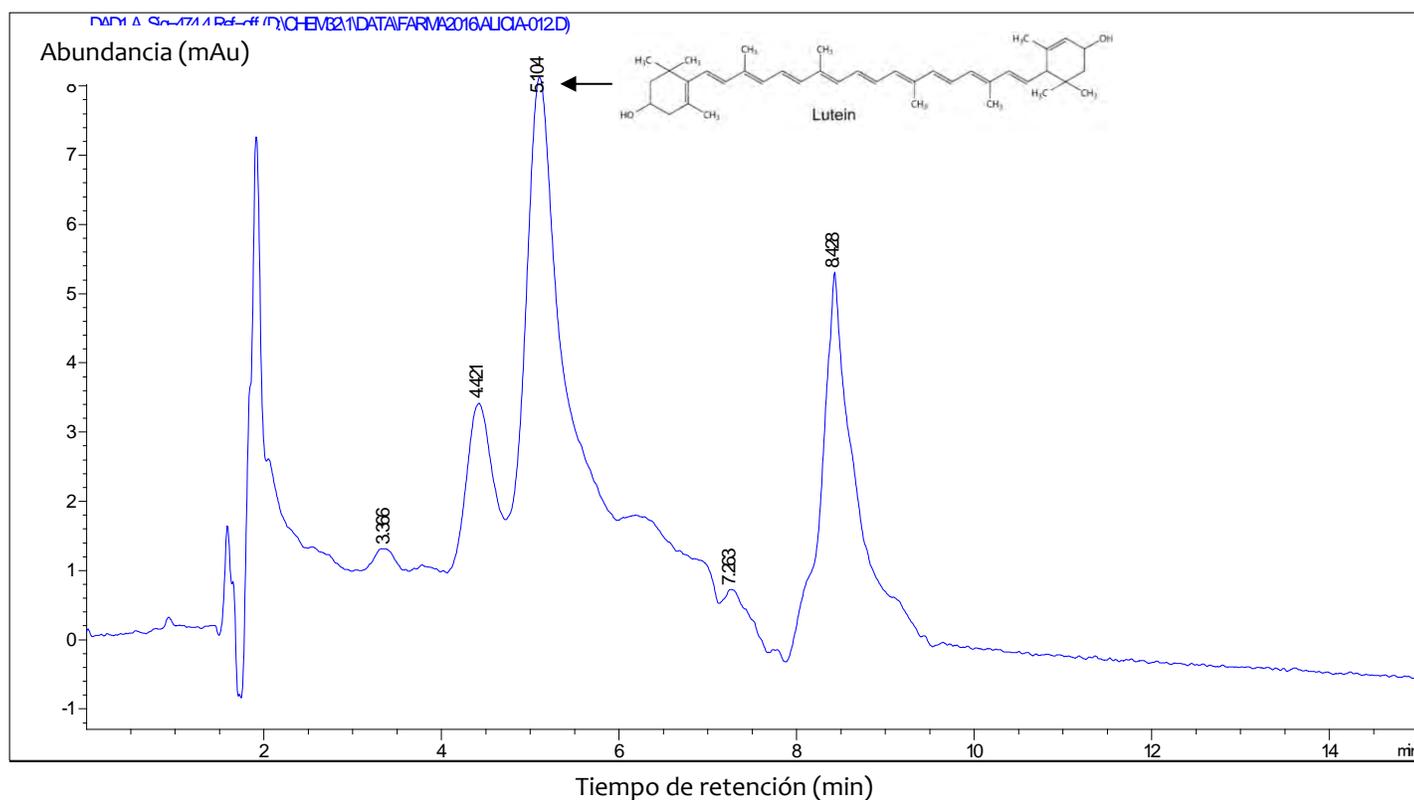
**Figura 11.** Prueba cualitativa de alcaloides por reactivo de Meyer.

### Cuantificación de xantofilas totales por espectrofotometría

Este método se utilizó para la cuantificación de la proporción de xantofilas totales en pigmentos, obteniendo un total de 0.18 g/1kg de extracto y en 0.00517 kg de extracto de *P. laevigata* tenemos 0.00018 kg de xantofilas.

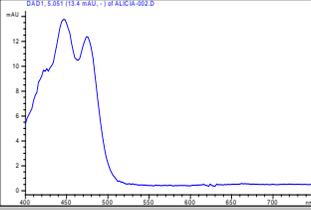
## Cuantificación de la proporción de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

De acuerdo con los resultados del cromatograma, si existe presencia de pigmentos en el extracto de *P.laevigata* de los cuales se pudo identificar, luteína, zeaxantina y cantaxantina, estas se encontraron en 10 mL evaporados y resuspendidos con hexano (figura 12 y cuadro 5).



**Figura 12.** Cromatograma del análisis HPLC de pigmentos del extracto de *P. laevigata*.

**Cuadro 5.** Espectro UV con el pico máximo de absorción de pigmentos de *P. laevigata*.

Tiempo de retención (min)	UV $\lambda$ máx (nm)	Espectro	Tipo de compuesto
5.051	448, 476		Luteína

### Análisis químico

Después de comprobar la actividad biológica del extracto contra algunas cepas bacterianas se realizó el análisis químico mediante CG-EM, HPLC y HPLC-EM con el fin de determinar los posibles compuestos responsables de dicha actividad.

### Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Se presenta el cromatograma del análisis por CG-EM del extracto en la Figura 18, donde los ácidos linolénico y palmítico fueron los compuestos mayoritarios que se identificaron en el extracto (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Compuestos mayoritarios del extracto metanólico *P. laevigata*.

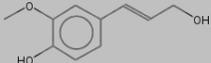
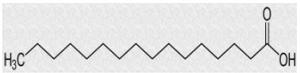
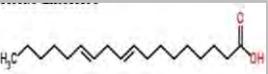
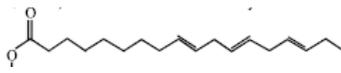
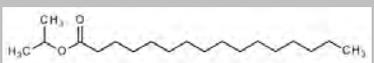
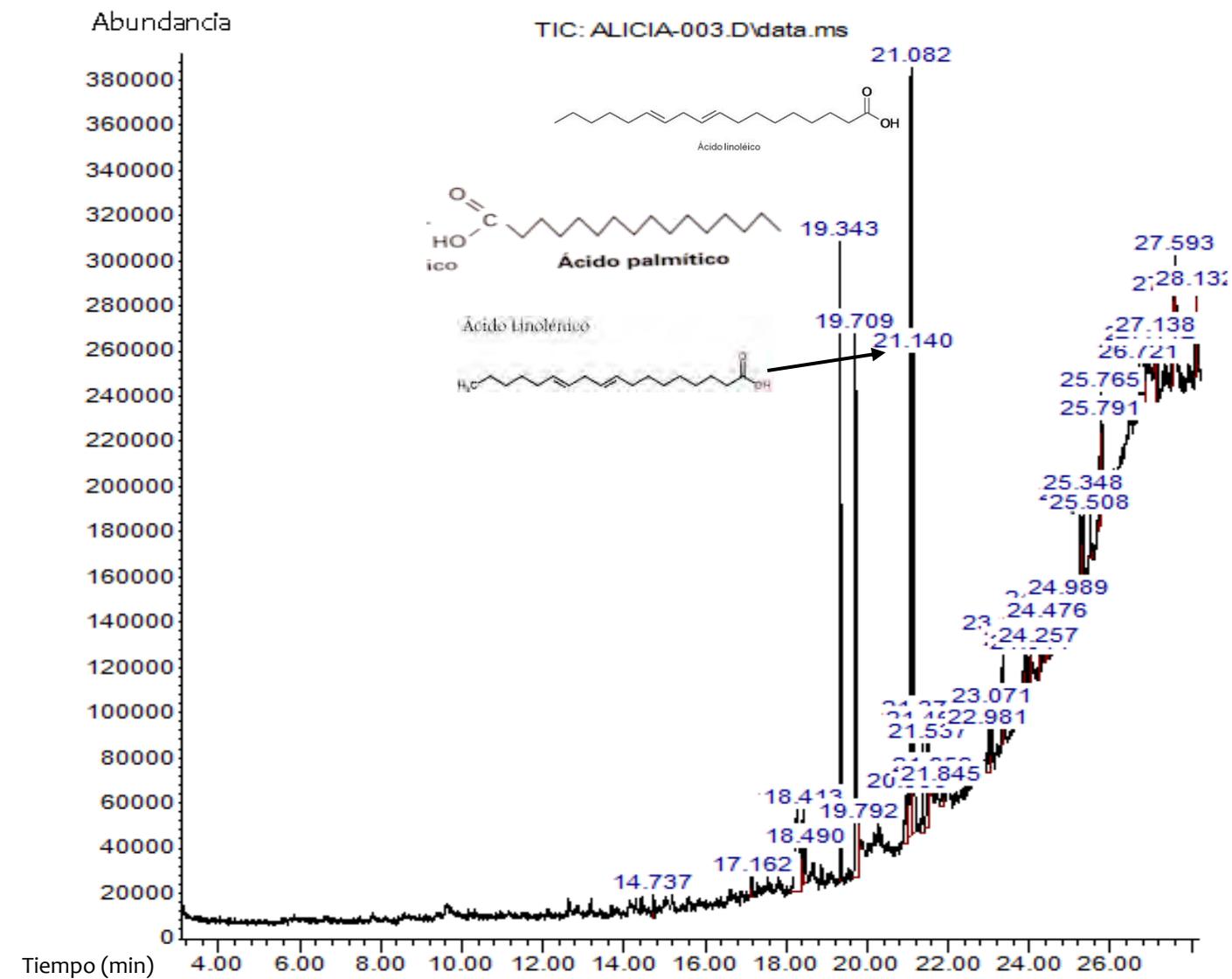
Pico	Tiempo Retención (min)	% Área	Compuesto	Estructura	Actividad
1	18.265	7.14	Alcohol coniferílico		Antinflamatorio (Saeed et al., 2012). Apoptótico en células neurales y del endotelio (Jiang et al., 2010).
2	19.343	24.38	Ácido palmítico		Antibacteriano (Zheng et al., 2005). Anticancerígeno (Kumar et al., 2010).
3	21.082	15.03	Ácido linoleico		Immunoestimulador, antiinflamatorio (Haro et al., 2006). Reducen enfermedades cardiovasculares (Castro, 2002).
4	21.140	10.41	Ácido linolénico		
5	21.371	1.99	Palmitato de isopropilo		

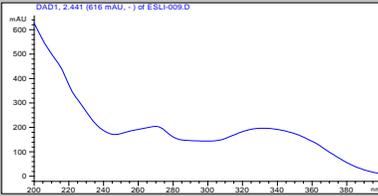
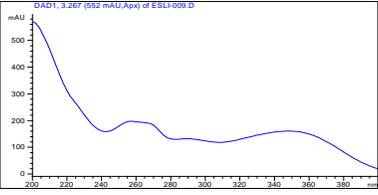
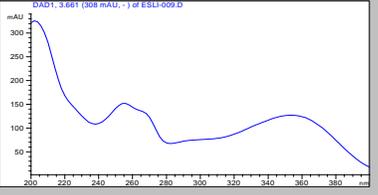
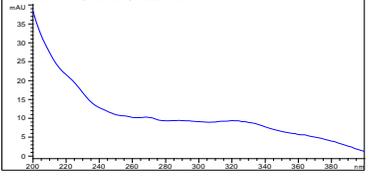
Figura 13. Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico de *P. laevigata*.

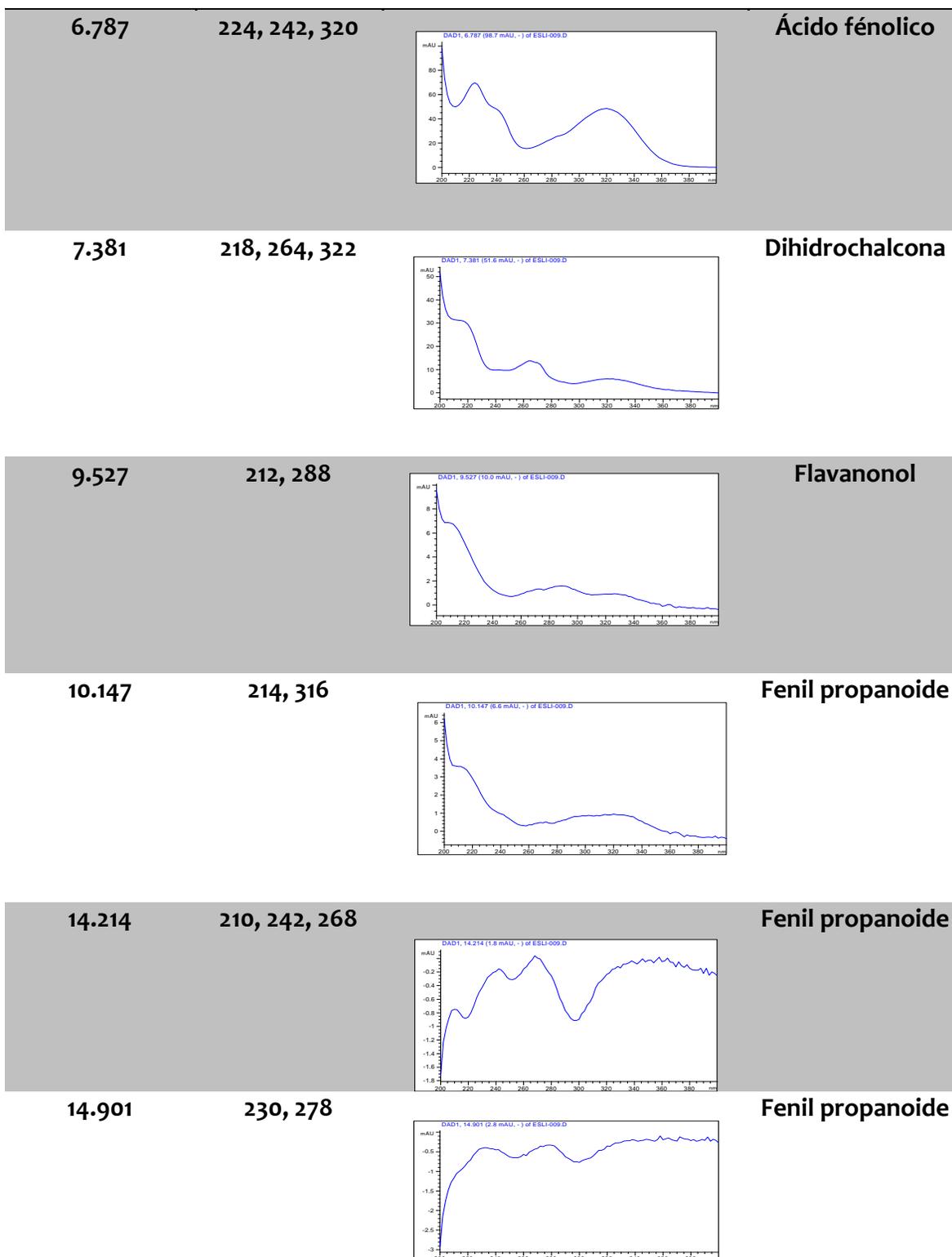


## Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

De acuerdo con los resultados del cromatograma (figura ), con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, el extracto presentó los siguientes compuestos que se pueden observar en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Espectros de UV con los picos máximos de absorción de *Prosopis laevigata*

Tiempo de retención (min)	UV $\lambda$ máx (nm)	Espectro	Tipo de compuesto
2.441	270, 332		Flavona
3.267	258, 266, 348		Flavonol
3.661	254, 268, 354		Isoflavona
5.334	268, 326		Isoflavona

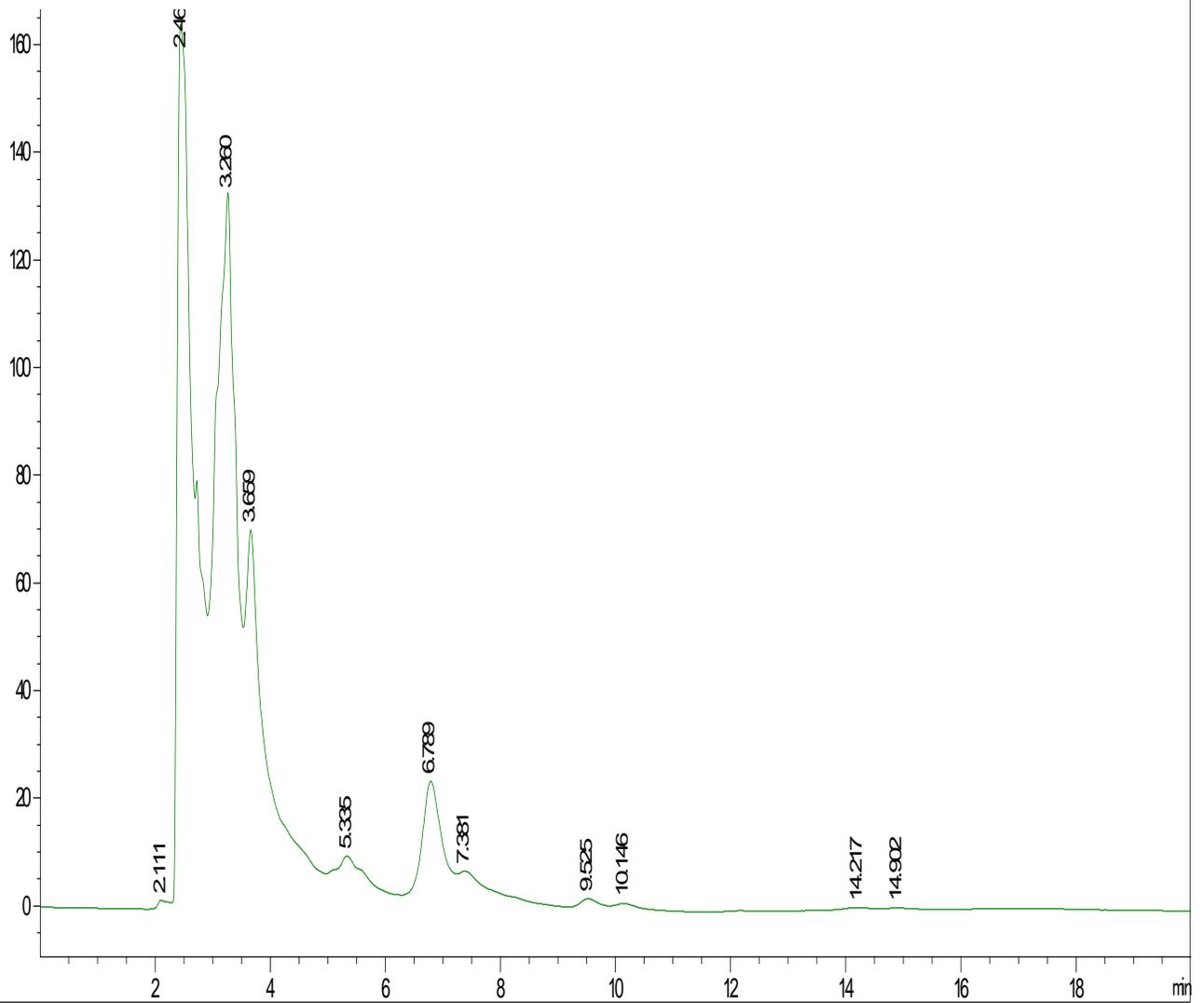


Tipo de compuesto con base a la comparación del espectro UV con Dey y Harborne, 1989.

Figura 14. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico de *P.laevigata*.

D:\1 F. Sr=2014R\Frff (7)\CHEM\B2\1\DATA\FARMA\2015\ESL-009.D

Abundancia (mAu)



Tiempo de retención (min)

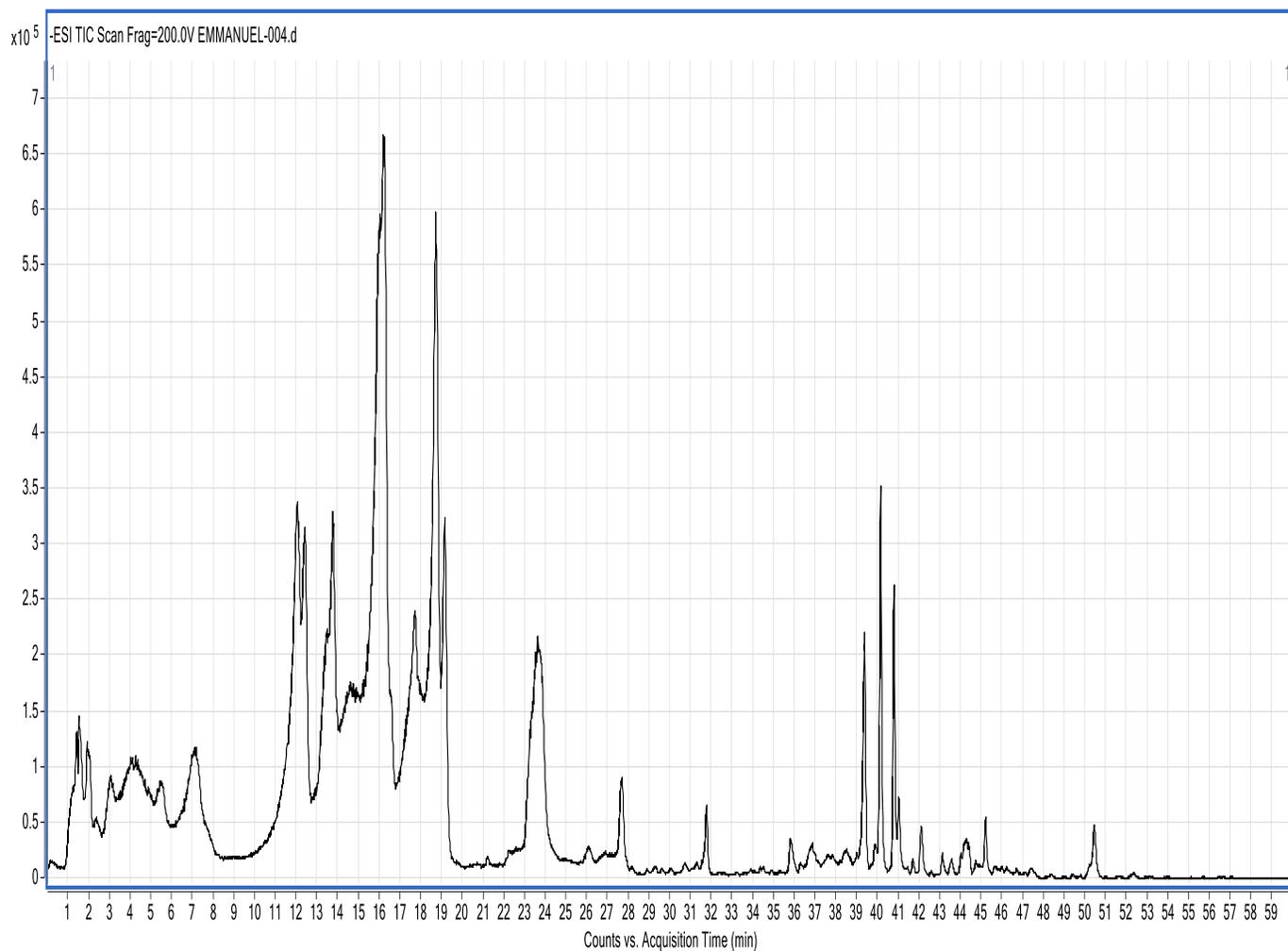
## Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-EM)

El cromatograma (figura ) nos muestra que el extracto de flor de mezquite posee compuestos de los cuales se lograron identificar algunos con la base de datos del equipo, estos se pueden observar en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Compuestos del HPLC-EM del extracto de *P.laevigata*

Ion (m/z)	[M – H] <sup>-</sup>	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Abundancia
96.9611	[M – H] <sup>-</sup>	-----	1.511	37982.77
341.1112	[M – H] <sup>-</sup>	-----	1.511	13491.37
377.0882	[M – H] <sup>-</sup>	-----	1.909	42329.7
304.096	[M – H] <sup>-</sup>	-----	3.054	4949.9
593.154	[M – H] <sup>-</sup>	-----	5.478	41866.6
593.154	[M – H] <sup>-</sup>	-----	7.121	74913.2
563.144	[M – H] <sup>-</sup>	-----	12.018	238968
303.054	[M – H] <sup>-</sup>	-----	13.727	133565
609.151	[M – H] <sup>-</sup>	-----	13.727	36337.6
151.0049	[M – H] <sup>-</sup>	Vainillina	13.727	381978
179.0002	[M – H] <sup>-</sup>	Acido cafeico	13.761	120539
609.15	[M – H] <sup>-</sup>	-----	16.217	465093
593.155	[M – H] <sup>-</sup>	-----	17.678	73098.5
623.166	[M – H] <sup>-</sup>	-----	17.678	109744
623.167	[M – H] <sup>-</sup>	-----	18.690	393106
623.166	[M – H] <sup>-</sup>	-----	19.138	228083
312.258	[M – H] <sup>-</sup>	-----	23.620	171793
762.33	[M – H] <sup>-</sup>	-----	27.653	54228.6
287.226	[M – H] <sup>-</sup>	-----	31.720	48279.3
277.219	[M – H] <sup>-</sup>	-----	39.339	173790
253.2189	[M – H] <sup>-</sup>	Crisina	39.804	463237
279.235	[M – H] <sup>-</sup>	-----	40.102	296505
255.234	[M – H] <sup>-</sup>	-----	40.750	227319
281.25	[M – H] <sup>-</sup>	-----	40.999	56386
283.2659	[M – H] <sup>-</sup>	Acacetina	42.078	356491

**Figura 15.** Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-EM) del extracto metanólico de *P. laevigata*.



## DISCUSIÓN

El género *Prosopis*, comúnmente conocido como mezquite, es uno de los grupos de árboles y arbustos más importantes de las regiones áridas y semiáridas de México, debido a que presenta una amplia distribución y una gran importancia ecológica y económica (Rzedowski, 1988).

Con respecto a su importancia ecológica, los mezquites son considerados mejoradores del suelo ya que establecen asociaciones con bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium*), las cuales incrementan la fertilidad. Además, poseen raíces profundas que evitan la pérdida de suelo y, por lo tanto, disminuyen la erosión, también son importantes porque pueden establecer interacciones con otros organismos que habitan en la comunidad (Roldán, 2004). Por ejemplo, sus flores y frutos proveen alimento a algunos animales como insectos, particularmente abejas, y mamíferos como borregos, burros, cabras y caballos (Frías-Hernández et al., 2000). Adicionalmente, su copa puede proporcionar sitios de refugio y reproducción para otros animales como las aves.

Las plantas de *Prosopis* sp. modifican el microambiente ya que disminuyen la pérdida de agua e incrementan la materia orgánica del suelo, favoreciendo la germinación de las semillas, la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas (Frías-Hernández et al., 2000).

En relación con el aspecto económico, los mezquites tienen gran importancia ya que desde la época prehispánica sus hojas, raíces, yemas y corteza han sido utilizados para diversos fines (Mata, 2009; Flores, 2011). Actualmente, la mayoría de sus estructuras se utiliza como planta medicinal.

*Prosopis laevigata*, es una especie endémica de México (Frías-Hernández et al., 2000) y corresponde al mezquite típico del centro y sur del país (Rzedowski, 1988). En el poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla el principal uso que se le da es como leña y madera para fabricar diversos artículos (Rosas, 2003). Es importante mencionar que no existen estudios sobre las flores de *P. laevigata* por lo que se decidió hacerlo por primera vez.

Los productos naturales tales como los extractos de plantas así como los compuestos purificados, son fuente de oportunidades ilimitadas para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos, debido a la amplia diversidad química que presentan las plantas (Sánchez, 2012).

El primer paso para aislar los compuestos biológicamente activos de los extractos naturales, es el proceso de extracción, el cual se considera crítico, debido a que la técnica debe extraer el o los compuestos de interés para su posterior purificación (Fabricant y Farnsworth, 2001). Además de que se ha observado que resulta de importancia para el aprovechamiento de sus propiedades medicinales la parte anatómica de la cual se obtiene el extracto o aceite esencial, e inclusive la época del año en que se realiza la colecta y el modo en el que se efectúa (Rodríguez, 2014). Fue por esto que el metanol se seleccionó como solvente para la elaboración de los extractos crudos ya que una gran gama de compuestos con posible actividad antimicrobiana son extraídos con este solvente, obteniendo así un rendimiento de 18.95%. Además, una planta puede contener cientos de compuestos y cada uno de ellos estar en diferente concentración, por lo tanto presentar diferentes efectos (Encarnación, 2010), conocidos como metabolitos secundarios constituyen el origen fundamental de los principios activos de las plantas medicinales y de su acción terapéutica (Cruz, 2007).

El extracto de *P. laevigata* mostró un total de compuestos fenólicos de 61.29 mg e AG/g, esto es importante pues va relacionado con la capacidad antioxidante donde mostró una  $CA_{50}$  baja de 591.38  $\mu\text{g/mL}$  (figura 25) pero si se compara con la quercetina que es un compuesto puro tuvo una  $CA_{50}$  de 3.4  $\mu\text{g/mL}$  es importante mencionar que el extracto es una mezcla de varios compuestos que actúan en conjunto, puesto que los compuestos fenólicos o polifenoles; desarrollan acciones terapéuticas antisépticas y antiinflamatorias de órganos urinarios, acciones analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas (Cruz, 2007).

Por otra parte el extracto tuvo 3.64  $\mu\text{g (eQ)}/\text{g}$  de flavonoides, este si va relacionado con los fenoles y capacidad antioxidante mostrados, además que se sabe que los flavonoides

presentan propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, diuréticas, actividad antiagregante plaquetaria, antioxidante, aumento de la resistencia de los capilares sanguíneos, efecto sobre receptores estrogénicos útil en la sintomatología menopáusica (Cruz, 2007).

Los alcaloides son compuestos orgánicos de origen natural compuestos de C, H, O y N (el nitrógeno se encuentra intracíclico), derivados de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación presentan reacción básica, son fijas o volátiles y su constitución molecular no se conoce con precisión en algunas de ellas. En las plantas se hallan generalmente formando sales con los diversos ácidos orgánicos, la función de los alcaloides en las plantas no es del todo clara, sirven como productos de desecho o almacenamiento del nitrógeno sobrante, éstos se encuentran localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir, en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; cumpliendo una importante función como proteger a la planta, por su sabor amargo y agrio del ataque de insectos, sirven como reguladores del crecimiento, son sumamente tóxicos; pero se emplean, sin embargo, ampliamente en medicina administrados en pequeñas dosis, pues su actividad farmacológica es muy amplia: posee propiedades analgésicas y actividad depresora del sistema nervioso central, estimulante del sistema nervioso, acción antiasmática, acción colerética (Cruz, 2007; Arango, 2008; Zamacona et al., 2010). Al realizar la prueba de alcaloides el extracto mostró actividad con el reactivo de Meyer presentando una coloración amarilla, coinciden con los resultados obtenidos por Zamacona et al. (2010) al obtener los alcaloides de *Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida* en frutos y hojas, en otro estudio realizado por Rodríguez et al. (2014) reportó que de las hojas de *P. juliflora* se han aislado los alcaloides juliflorina, julifloricina y julifloridina que poseen actividad antimicrobiana, es recomendable hacer pruebas más detalladas para conocer qué clase de alcaloides posee el extracto de *Prosopis laevigata*.

Todas estas propiedades actuando en conjunto participan en la actividad antimicrobiana que posee el extracto metanólico de *P. laevigata*, pues mostró actividad inhibitoria frente a cepas Gram positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 con una media 17 mm, y *Staphylococcus aureus* ATCC (caso clínico) con 13 mm, las otras 4 cepas (*Enterobacter faecalis* CDBB-B1533, *Staphylococcus aureus* 85 S Met, *Streptococcus mutans* CDBB-B 1455 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) mostraron valores de 10.0 mm hasta 7.0 mm mientras que el control positivo Cloramfenicol obtuvo halos mayores en las 6 cepas con 28.0 mm como la máxima media, basándonos en los límites propuestos por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) el extracto concuerda con la categoría de Intermedia (16 – 29 mm) y Resistente (inferior a 15 mm) (Picazo, 2000) y en cepas Gram negativas presentando halos de inhibición en *Enterobacter aerogenes* CDBB-B968 21.4 mm, *Vibrio cholera* (caso clínico) con 21.0 mm, *Escherichia coli* (FESI caso clínico 2) con 18.33 mm, *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999 con 14.0 mm, *Enterobacter cloacae* (FESC) con 12.20 mm el extracto tiene la categoría de Intermedia (16 – 29 mm) y Resistente (inferior a 15 mm) (Picazo, 2000), mientras que las 8 cepas restantes (*Escherichia coli* caso clínico 1, *Enterobacter aerogenes* CDBB-B958, *Proteus mirabilis* Caso clínico, *Salmonella typhimurium* FESC, *Vibrio cholerae* CDBB-B 1159, *Enterobacter aerogenes* CDBB-B 968 y *Salmonella typhi*) presentaron halos de inhibición entre 8.0 mm a 5.0 mm con una clasificación de Resistente Inferior a 15 mm (Picazo, 2000), mientras que con Cloramfenicol la mayoría presentó halos de inhibición de 5.25 mm hasta 29.0 mm como máximo, esto concuerda con investigaciones anteriores pues Gómez et al. (2014) trabajó con extractos metanólicos de plantas de la familia *Fabaceae* con los cuales se obtuvo marcada actividad inhibitoria en cepas como *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, al igual que Sánchez (2012) evaluó el efecto de extractos de plantas sobre la actividad antibacteriana demostrando que los extractos metanólicos de mezquite y huizache mostraron inhibición de 16.0 a 25.9 mm, y Aqeel et al. (1989) mostró que los extractos de *Prosopis juliflora*, tienen actividad inhibitoria contra de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus*.

Para evaluar la magnitud con que el extracto de *P. laevigata* afectó a cada cepa se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) que es la concentración más baja de un antimicrobiano a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano (donde es visible una reducción drástica del mismo) y la concentración bactericida mínima (CBM) que es la concentración más baja de un antimicrobiano a la cual se inhibe el 99.9% de la población. El ensayo mostró en algunas cepas CMI bajas de 0.312 mg/mL, de acuerdo con Domingo y López-Brea (2003), pruebas de sensibilidad *in vitro*, se consideran CMI altas de 100-1000 mg/mL. En el extracto se eligieron las cepas de *S. aureus* con CMI y CBM de 0.312 mg/mL y 0.625 mg/mL respectivamente mientras que en *V. cholerae* las CMI y CBM fueron de 0.625 mg/mL y 1.25mg/mL respectivamente, estas cepas principalmente son causantes de enfermedades intestinales por alimentos contaminados (Borbolla et al., 2004).

Estos resultados coinciden con otros estudios donde cabe resaltar que se hicieron con otras partes de la planta o árbol y nunca con las flores, tal es el caso de García et al. (2006), probaron 32 extractos de plantas medicinales comúnmente utilizadas en México, de las cuales el extracto etanólico de *Acacia farnesiana* inhibió efectivamente el crecimiento de 2 cepas de *V. cholerae*, presentando CMB's entre 4.0-7.0 mg/mL dependiendo de la cepa probada. La sensibilidad mostrada de *S. aureus* y *V. cholerae* podría deberse a la alteración en la membrana citoplasmática de la bacterias y al contenido de ácidos grasos y proteínas que posiblemente se encuentren en el extracto (UdelaR, 2006).

Por otra parte el extracto frente a las cepas *S. aureus* (figura 8) y *V. cholerae* (figura 9) mostró un comportamiento bactericida sobre las curvas de crecimiento, en ambos casos desde los primeros tiempos se observó el descenso de la población bacteriana. Para corroborar la toxicidad del extracto se utilizó el modelo de *Artemia salina* demostró que a partir de la concentración de 10 ppm, 100 y 1000 ppm murió el 100% de los nauplios, de acuerdo con estos resultados se puede decir que el extracto de *P. laevigata* manifestó toxicidad fuerte frente a *A. salina*. El valor de CL50, producto del bioensayo, no muestra una actividad fisiológica o biológica en particular; es indicador de toxicidad a nivel celular,

que puede orientar investigaciones específicas futuras, en busca de nuevos productos naturales bioactivos (Sánchez, 2005).

El perfil de pigmentos mostró que el extracto de *P. laevigata* posee 0.18 g/Kg del extracto, este resultado pudo ser debido a que la producción de estos compuestos se ve afectada principalmente por la luz, Dorais et al (2001) reportaron que cuando las radiaciones solares fueron menores en los meses de noviembre y diciembre, se favoreció la acumulación de estos compuestos y por el contrario en los meses de mayor radiación solar el contenido fue menor debido posiblemente a que esta puede estar dañando a los pigmentos oxidándolos y transformándolos en grupos epóxido. Este ensayo se complementó con una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para cuantificar pigmentos en el cual mostró que si posee pigmentos, pudiendo identificar xantofilas como luteína que protege a la planta contra radiación solar (Sánchez, 2008).

El cromatograma de (HPLC), mostró que el extracto de *P. laevigata* posee compuestos como las flavonas que deben su actividad a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana (Domingo y López-Brea, 2003), flavonoles, flavanonas, isoflavonas, antocianósidos, son para los vegetales sustancias muy importantes pues son responsables del color de muchas flores, frutos y hojas y por ello fundamentales para la polinización y para la protección frente a la radiación ultravioleta, además de ejercer una eficaz actividad antioxidante, con muchas aplicaciones terapéuticas: antiinflamatorias, diuréticas, actividad antiagregante plaquetaria, antioxidante, aumento de la resistencia de los capilares sanguíneos, efecto sobre receptores estrogénicos útil en la sintomatología menopáusica (Cruz, 2007), además de otros compuestos como ácido fénilico, dihidrochalconas, flavanonol y fenil propanoides que poseen propiedades antioxidantes, antibacterianas, antiespasmódicos, antiulcerosos, antiinflamatorios, antialérgicos, antihepatotóxicos, antitrombótico por mencionar algunas de ellas (Martínez, 2005; Pérez, 2003; Varas, 2004; Martínez, 2002).

El análisis del cromatograma de gases masas mostró que los compuestos mayoritarios en el extracto son el ácido linoleico que posee propiedades antibacterianas, anticancerígenas (Zheng et al. 2005; Kumar et al. 2010), el ácido linolénico con propiedades inmunoestimuladoras, antiinflamatorias, además que reducen enfermedades cardiovasculares (Castro, 2002; Haro et al., 2006) y el ácido palmítico que posee propiedades antiinflamatorias, es apoptótico en células neurales y del endotelio (Jiang et al., 2010; Saeed et al., 2012).

El análisis de HPLC de gases masas mostró que el extracto de *P. laevigata* posee 25 flavonoides diferentes pero solo 4 se encuentran en la base de datos y se pudieron identificar como Vainillina, que posee propiedades antidiarreicas, antimutagénicas, antineoplásicas, antioxidantes, neurodepresivas, antiinflamatorias (Trapero, 2013), el Ácido cafeico que contiene propiedades antioxidantes, además de ejercer efectos quelantes y modular la actividad de varios sistemas enzimáticos (Gutiérrez, 2002), Crisina y Acetina con propiedades antioxidantes (Reynaldo et al., 2001) los compuestos existentes actúan en sinergia y posiblemente son los que le confieren las propiedades antibacterianas al extracto de *P. laevigata*.

## CONCLUSIÓN

- Se comprobó por primera vez que el extracto de las flores de *P. laevigata* mostró actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.
- El extracto de las flores es bactericida sobre *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*
- El extracto mostró capacidad antioxidante baja.
- El extracto presenta compuestos fenólicos y flavonoides.
- El extracto posee toxicidad fuerte.
- El extracto posee como pigmento principalmente luteína.
- El extracto posee compuestos como Vainillina, Acido cafeico, Crisina y Acetina.

## APENDICES

### Apéndice 1

#### Descripción botánica (Cervantes et al., 2002; Flores, 1993)

#### *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst

##### Taxonomía

Nombre común: Mezquite, Mimosa, Acacia

Reino: *Plantae*

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Subclase: *Rosidae*

Orden: Fabales

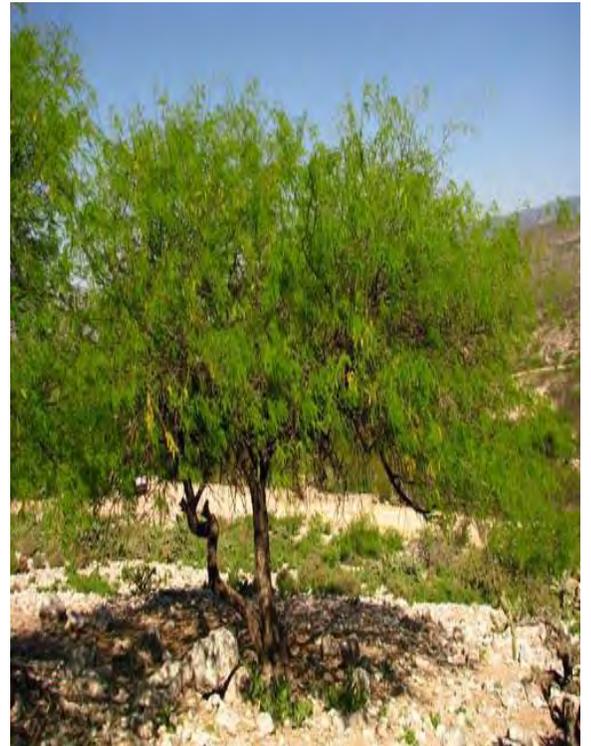
Familia: *Fabaceae*

Subfamilia: *Mimosoideae*

Género: *Prosopis*

Especie: *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.)

M.C. Johnst.



**Figura 16.** Mezquite *Prosopis laevigata*

El mezquite es un árbol o arbusto espinoso, perenne, que llega a medir hasta 10 m de altura, de acuerdo con la profundidad del suelo.

**Raíz:** Su raíz principal puede alcanzar hasta 50 m de profundidad, para llegar al manto freático de agua subterránea; sus raíces se extienden en un radio hasta de 15 m.

**Troncos y ramas:** Tronco leñoso, de corteza oscura o negruzca; ramas flexuosas, formando una copa esférica o deprimida. Las ramas tiernas son espinosas y con frecuencia carecen de hojas.

**Hojas:** Son compuestas (con el limbo subdividido), bipinnadas, con 12 a 15 pares de folíolos oblongos o lineares de 5 a 10 mm de largo, más o menos persistentes, pero caducas en invierno. Los renuevos nacen desde marzo hasta mayo y permanecen hasta diciembre.

**Flores:** Son muy pequeñas, de color amarillo verdoso, agrupadas en inflorescencias en racimos en forma de espiga; producen un aroma y néctar agradable que atrae a los polinizadores. Son hermafroditas, de simetría radiada (actinomorfas), con cinco sépalos, cinco pétalos y diez estambres; ovario súpero, unilocular, unicarpelar y de placentación parietal; el estigma es cóncavo. Florece durante un corto período que se inicia en febrero-marzo y termina en abril-mayo.

**Fruto:** Los frutos son vainas o legumbres alargadas, rectas o arqueadas, de 10 a 30 cm de longitud, de color paja a rojizo violáceo. El mesocarpio contiene de 12 a 20 semillas. La fructificación se extiende de mayo a agosto y se cosecha entre agosto y octubre.

**Semilla:** Es de forma oblonga o aplastada, dura; su color varía de café claro a oscuro. La diseminación de las semillas es zoófila y endozoica, es decir, su dispersión se hace por medio del tracto digestivo de animales. (CONAZA, 1994).



**Figura 17.** Fruto, hojas y flores de *P. laevigata*

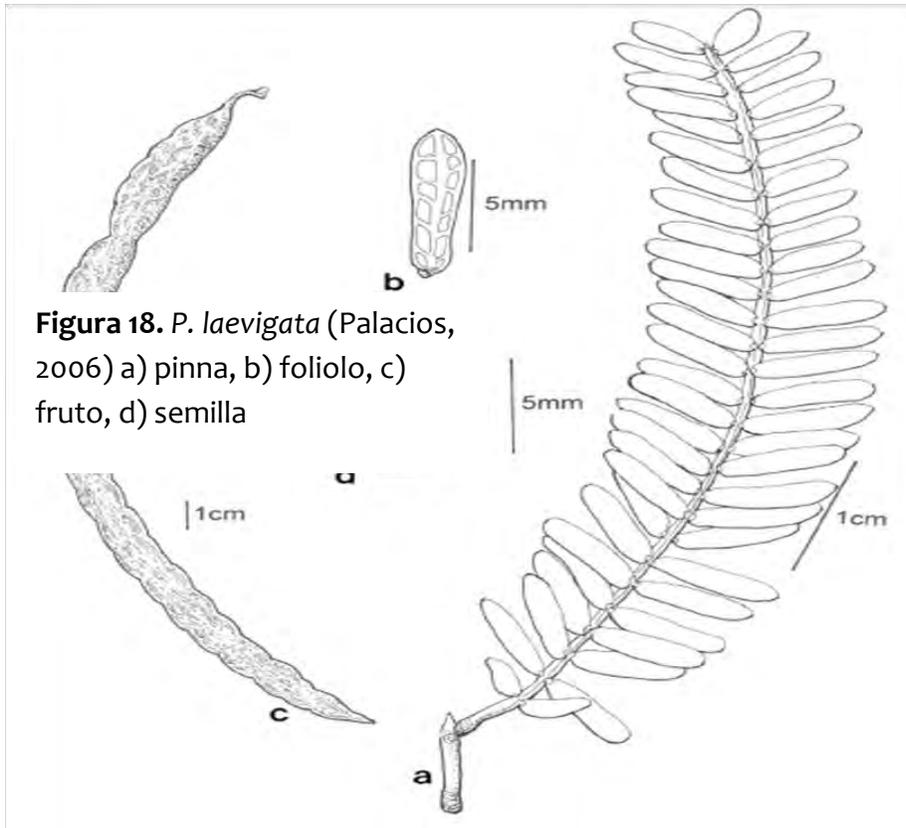


Figura 19. Distribución de Mezquite *P. laevigata*

**Distribución geográfica:** Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Distrito Federal, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas.

**Condiciones climáticas:** El mezquite está clasificado como especie termo-xerófila, se localiza en condiciones climáticas diversas, que van desde los climas calientes hasta los templados y de los semi-húmedos hasta los muy secos; sin embargo, su principal rango de distribución se encuentra en las zonas áridas y semiáridas del país, en su área de localización la temperatura media anual es de 20 a 29 °C, mientras que la precipitación media anual fluctúa de 350 a 1200 mm. El aire seco y la luminosidad son esenciales para la fructificación.

**Condiciones edáficas:** El mezquite se establece en una amplia gama de tipos de suelos; sin embargo, crecen con más vigor en los suelos profundos, como en las partes bajas de los valles, mientras que su altura es menor en las laderas de los cerros o suelos delgados. Prosperan en suelos arenosos, así como en los acillosos-arenosos, pueden tolerar un alto contenido de sales o mal drenaje en el suelo.

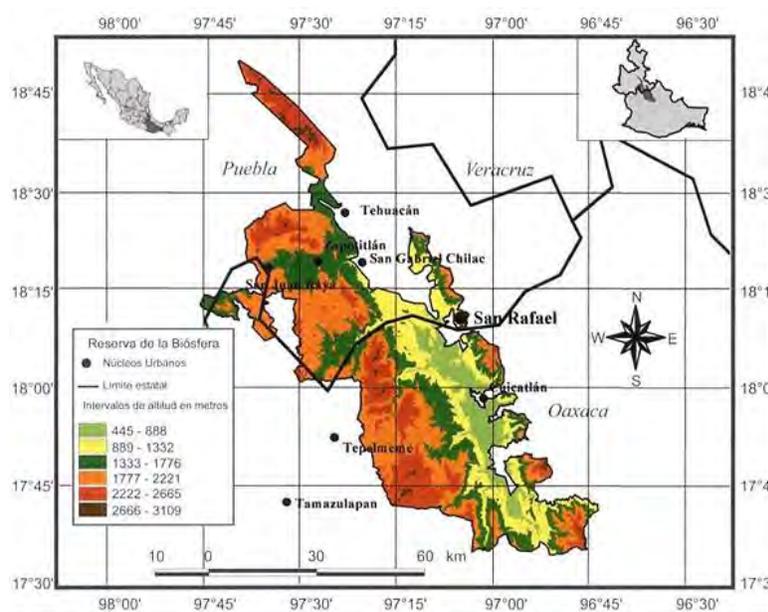
Los tipos de suelo donde crece son sierozem y chesnut, ya que son característicos de los lugares donde se encuentra distribuido el mezquite en nuestro país.

El mezquite tiene un amplio rango e distribución, se le encuentra hasta 2300 msnm.

## Apéndice 2

### Zona de colecta

La flor de *Prosopis laevigata* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el Valle de San Rafael Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 25).



**Figura 20.** Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán

### Clima

El clima es de tipo Bs (h') w'' (w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

## **Hidrografía**

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1996).

## **Edafología**

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

## **Vegetación**

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000).

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como *Fouqueria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*. En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

### **Población**

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y en 2001 se contaba con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001), actualmente no se cuenta con estudios demográficos. La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

## Apéndice 3

### **Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer**

**(Cole, 1994; VandenBerghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945).**

Ésta técnica es empleada para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica (levaduras), de un extracto puro o de los compuestos de un extracto, los cuales se difunden a través del agar desde el disco de papel. El crecimiento del microorganismo comienza y los compuestos se alejan del disco de acuerdo a un gradiente de dilución, de modo que a mayor distancia del disco menor concentración, formándose un halo de inhibición circular donde la sustancia no alcanza a inhibir el crecimiento y cuyo diámetro es proporcional a la potencia de la sustancia frente al microorganismo.

#### **Medio**

Para el ensayo con bacterias se prepara medio de cultivo Müeller-Hinton ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición. Se debe dejar incubar las cajas 24 horas previas a realizar la prueba de susceptibilidad para verificar la ausencia de contaminación del agar.

#### **Inóculo**

Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müeller-Hinton para el ensayo en bacterias, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante aproximadamente 18 a 24 horas para bacterias o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una

concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 mL de sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ) a 99.5 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.36 N. La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar con un espectrofotómetro a 660 nm.

Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de bacterias, antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa con agar de Müller-Hinton para bacterias. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie de agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente  $60^\circ$  luego de cada estría.

### **Preparación de sensidiscos**

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5, para posteriormente aplicar la sustancia a evaluar en la prueba de susceptibilidad (extracto o fracción).

### **Extracto o fracciones activas**

Se hacen diluciones necesarias utilizando como vehículo metanol, para que los sensidiscos lleven 2 mg de la sustancia por sensidiscos.

### **Control negativo**

Se preparan sensidiscos a los que se les agregan 10  $\mu\text{L}$  del solvente empleado para disolver el problema.

### **Control positivo**

Se evalúa la sensibilidad de las cepas bacterianas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol. Posteriormente se deja evaporar el solvente de los discos impregnados durante 12 horas.

### **Prueba de susceptibilidad**

Los discos impregnados con las sustancias a ser evaluadas se colocan manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36 °C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Es preciso evitar presión de CO<sub>2</sub> debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso de pH. El desarrollo de algunos microorganismos es debido al pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Así mismo, 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.

### **Interpretación de resultados**

En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto o fracción como activa. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. La prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

## Apéndice 4

### Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985)

La microtécnica de dilución en caldo se utiliza para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM).

#### Medio

Esta técnica sigue el mismo principio que el método de macrodilución en agar, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos (bacterias y levaduras) a los antimicrobianos se determina en fase líquida, en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica con 96 concavidades (placa de ELISA). La placa se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg/mL.

#### Inóculo

Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) para bacterias posteriormente se incuba a 35°C durante 24 horas produciendo una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  organismos y se diluyen en caldo Müller-Hinton para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^5$  organismos/mL. En cada una de las 96 concavidades se colocaron 50 µL de las suspensiones diluidas.

#### Control negativo

Se coloca 50 µL de caldo Müller-Hinton con el solvente empleado para disolver el problema.

#### Testigo

Se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton en las concavidades más 50 µL del cultivo bacteriano.

### **Incubación**

Una vez cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con una tapa para evitar el desecamiento. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas.

### **Interpretación de resultados**

Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50 µL de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC). La placa se incuba 30 min.

En las concavidades donde se desarrollen organismos, el colorante es reducido a formazán, produciéndose una coloración rojiza-violácea, en el fondo de la concavidad 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 que esto puede alterar los resultados.

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM). En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado para obtener resultados estadísticamente significativos

## Apéndice 5

### Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano

(Muroi et al., 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la inactivación.

#### Medio de cultivo

Se coloca agar Müller-Hinton en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm.

#### Inóculo

Se prepara una suspensión con aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación). Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1 mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen los extractos a evaluar.

La concentración final es de aproximadamente de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se incubará en una estufa a  $35^\circ\text{C}$  sin presión de  $\text{CO}_2$ .

#### Tubos con extracto

Se prepara en tubos con 10 ml de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de CMI y sus múltiplos medios; es decir, la mitad del CMI ( $\frac{1}{2}$  CMI) y CBM.

Se muestrea cada hora durante los primeros 4 tiempos:  $T_0-0$ ,  $T_1-1$ ,  $T_2-2$ ,  $T_3-3$ ,  $T_4-4$  (tiempo-horas transcurridas), después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 hrs y finalmente a las 24 hrs.

En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo.

### **Testigo**

Se prepara un tubo sin extracto como testigo.

### **Incubación**

Las cajas se incuban durante 24 hrs a 35°C.

### **Interpretación de resultados**

Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

## Apéndice 6

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

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

Para hacer eclosionar los quistes se incuban de 24 a 48 horas con buena oxigenación, a una temperatura de 25 °C aproximadamente e iluminación artificial (luz blanca).

En frascos viales transparentes se colocan 10 mL de agua de agua de mar, se aforan los frascos hasta 10 mL, posteriormente se colocan 10 larvas por frasco.

La concentración del problema a ensayar son 125 mg/mL, 12.5 mg/mL y 1.25 mg/mL 1000, 100 y 10 ppm respectivamente.

#### **Control Negativo.**

Se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el solvente empleado para disolver la muestra (extracto), se emplea el mismo volumen en que se disuelve la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar (500 µL).

#### **Control Positivo**

Se utiliza ácido gálico, su CL<sub>50</sub> fue de 321.5 ppm.

#### **Incubación**

Los cultivos se mantienen iluminados (luz blanca) a una temperatura de 23-25°C durante 24 o 48 horas, hasta que los quistes haya eclosionado.

#### **Interpretación de resultados**

Se cuenta el número de larvas sobrevivientes, las cuales se desplazan de la misma manera que el grupo testigo.

La concentración letal media (CL50) se determina para cada extracto interpolando en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en mg/mL y a través del análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la LC50 está entre 500 y 1000 ppm, moderada cuando la LC50 está entre 100 y 500 ppm, y señalado como fuerte cuando al LC50 se extiende a partir de 0 a 100 ppm.

Como en este ensayo se registró un bajo número de larvas sobrevivientes se aplicó la siguiente ecuación: %Letalidad=LM/LSx100, donde: LM=larvas muertas y LS=larvas sobrevivientes, se calculando así el porcentaje de letalidad, con el resultado se clasifico el extracto de la flor según el Criterio del Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (Pinzón et al., 1995).

Cuadro. Clasificación de toxicidad según CYTED

<b>I</b>	<b>Extremadamente tóxico</b>	<b>1 – 10</b>	<b>µg/mL</b>
<b>II</b>	<b>Altamente tóxico</b>	<b>10 – 100</b>	<b>µg/mL</b>
<b>III</b>	<b>Moderadamente tóxico</b>	<b>100 – 500</b>	<b>µg/mL</b>
<b>IV</b>	<b>Ligeramente tóxico</b>	<b>500 – 1000</b>	<b>µg/mL</b>
<b>V</b>	<b>Prácticamente no tóxico</b>	<b>1000 – 1500</b>	<b>µg/mL</b>
<b>VI</b>	<b>Relativamente inocuo</b>	<b>&gt; 1500</b>	<b>µg/mL</b>

## Apéndice 7

### Conteo de fenoles totales (CFT) (Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles (CFT) totales se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, donde es empleado el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo de coloración amarilla y pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que tienen la capacidad de reaccionar con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de las moléculas (Gutiérrez et al., 2008).

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que es una pequeña molécula que debido a su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo  $-OH$  (Aguilar, 2003).

#### Curva de calibración

Se utiliza una solución estándar ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de ésta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

#### Preparación del extracto

Se prepara una solución estándar (200  $\mu\text{g/mL}$ , de la cual se toma una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  y se agregan 750  $\mu\text{L}$  de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón (ácido gálico $\mu$ L)	Agua destilada ( $\mu$ L)	Agua destilada (mL)	Folin-Ciocalteu ( $\mu$ L)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25	968.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.025	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
Problema	-----	250	750	7	500	1.5
Problema	-----	500	500	7	500	1.5

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu.

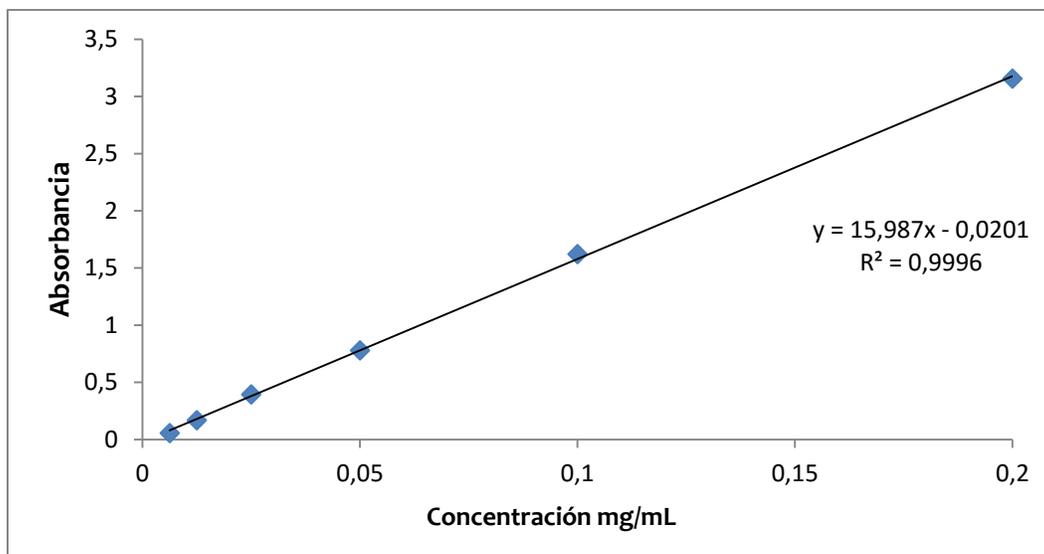
Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL.

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

### Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar.

Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.



**Figura 21.** Curva patrón de ácido gálico

## Apéndice 8

### Contenido de Flavonoides Totales.

#### Método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007).

Este método se basa en el cambio de coloración de una solución de  $\text{AlCl}_3$  (incolora) a amarilla por la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4 y, o bien el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, así como por la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides (Kalita et al., 2013).

#### Stock de quercetina

Se pesan 3 mg de quercetina en 3 mL de MeOH grado HPLC.

#### Curva patrón

Se toman las alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm y se les agrega 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 2%.

Para la concentración de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm hacer:

Del stock de quercetina tomar 20  $\mu\text{L}$  que llevarán 0.02 mg = 20  $\mu\text{g}$  y agregar 180  $\mu\text{L}$  de MeOH, el volumen final serán 200  $\mu\text{L}$ . De este nuevo stock tomar:

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ Stock Quercetina	$\mu\text{L}$ MeOH	( $\text{AlCl}_3$ ) al 2%
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

Del stock de quercetina (3 mg en 3 mL de MeOH) tomar:

[ ] ppm	μL Stock Quercetina	μL MeOH	(AlCl <sub>3</sub> ) al 2%
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

### Stock de extracto

Se pesa 3 mg de extracto metanólico, se disuelve en 3 mL de MeOH grado HPLC.

### Blanco

Se toma 1 mL del stock del extracto y 1 mL de MeOH grado HPLC.

### Problema

Se toma 1 mL del stock del extracto y se le agrega 1 mL de AlCl<sub>3</sub> al 2%.

Se vacían 200 μL de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA, por triplicado.

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 450 nm.

### Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola el promedio de la absorbancia de la muestra a evaluar.

Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto.

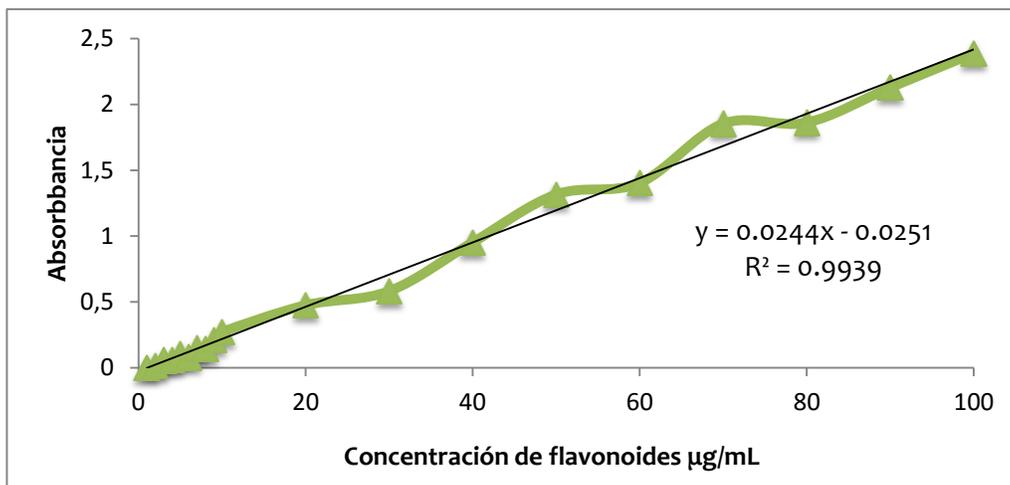


Figura 22. Curva patrón de quercetina

## Apéndice 9

### Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•)

(Okusa et al., 2007)

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•) es un radical libre, con un electrón desapareado que le da una coloración violeta y que no se dimeriza. Cuando el DPPH• está en contacto con una sustancia que le puede donar un átomo de hidrógeno, éste se reduce produciendo un cambio de color de violeta a amarillo, coloración dada por el grupo picril (Molyneux, 2004).

Con base a lo anterior, la Capacidad Antioxidante Media (CA50) se evalúa midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de DPPH•, por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm). A partir de la medición obtenida por medio de espectrometría UV-VIS, se determina la concentración a la cual el radical es reducido al 50%.

#### Solución DPPH

Se prepara en un matraz aforado pesando 0.00197 (0.002 gr) y agregando 50 mL de MeOH grado HPLC.

#### Stock de extracto

Se prepara una solución con 5 mg del extracto o fracción a evaluar y disolverlos en 5 mL de MeOH grado HPLC.

Las concentraciones a evaluar son las siguientes: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm, las cuales se preparan siguiendo la tabla, en frascos de 1 mL.

Para la concentración de 1, 2, 3 y 4 ppm hacer:

Del stock (5 mg en 5 ml MeOH) tomar 20  $\mu\text{L}$  que llevarán 0.02 mg = 20  $\mu\text{g}$  y agregar 180  $\mu\text{L}$  de MeOH, el volumen final serán 200  $\mu\text{L}$ . De este nuevo stock tomar:

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ stock	$\mu\text{L}$ MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960

Del stock (5mg en 5 mL de MeOH) tomar:

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ stock	$\mu\text{L}$ MeOH
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	998
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750
300	300	700
400	400	600
500	500	500
600	600	400
700	700	300
800	800	200
900	900	100
1000	1000	0

### **Aplicación de sustancias**

En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-1000 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protege de la luz envolviéndola con papel aluminio y se incuba durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. Es importante señalar que se emplean este tipo de placas debido a que el material no reacciona con los solventes empleados.

### **Blanco**

Se llenan pozos con 200 µL de metanol grado HPLC.

### **Control positivo**

Se realiza una curva patrón de quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

### **Interpretación de resultados**

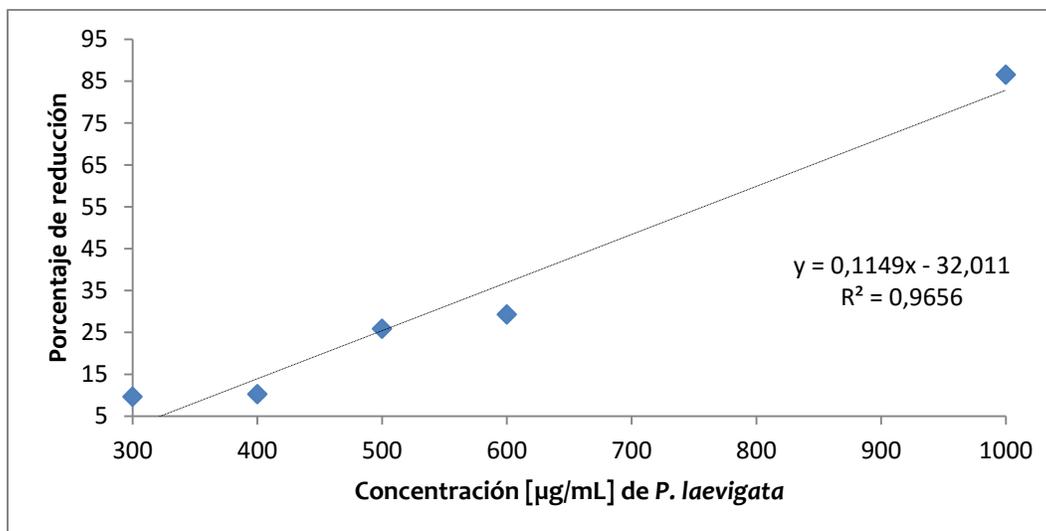
Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción del DPPH} = (C-E/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH.

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH (150 µL)+ Solución problema (50 µL)).



**Figura 23.** Actividad antioxidante del extracto MeOH por reducción del radical DPPH.

## Apéndice 10

### Detección de alcaloides

Las técnicas se basan en la capacidad que tienen los alcaloides de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio y tungsteno formando precipitados; estos ensayos preliminares se pueden realizar en el laboratorio o en el campo.

Una de las técnicas más usadas para su detección se realiza con el reactivo de Dragendorff en la cual se disuelve la muestra con ácido clorhídrico al 5%, posteriormente se filtra y se le agrega el reactivo de Dragendorff (tetrayodo bismuto de potasio), otra de ellas es con el reactivo de Mayer, se realiza el mismo procedimiento del reactivo anterior. La formación de precipitado rojo-naranja y la formación de precipitado blanco o amarillo claro indica la presencia de alcaloides respectivamente.

## Apéndice 11

### Cuantificación de xantofilas por espectrofotometría

Este método se utiliza para cuantificar la proporción de xantofilas totales en pigmentos, la extracción se basa en la saponificación de los pigmentos con hidróxido de potasio.

#### Muestra de pigmentos

Se pesan 200mg de pigmentos (extracto) y se colocan directamente en el matraz aforado de 100 mL ámbar.

#### Disolución extractora HEAT

Se prepara con Hexano: Etanol absoluto: Acetona: Tolueno en proporción (10:6:7:7) para preparar 30 mL.

#### Disolución acuosa de sulfato de sodio al 10%

Se pesan 5g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se disuelve en 50 mL de agua destilada

#### Disolución de Hidróxido de potasio al 40%

Se pesan 2g de KOH y se disuelve en 5 mL de Metanol grado HPLC

#### Blanco

Se prepara una disolución HEAT:Hexano (1:1),  
HEAT: (1000 $\mu\text{L}$ :600 $\mu\text{L}$ :700 $\mu\text{L}$ :700 $\mu\text{L}$ ), Hexano (3mL)

#### Preparación de la extracción

1. Se pesa una muestra de 200mg de pigmentos y se colocan directamente en el matraz aforado de 100mL ámbar.
2. Se añaden 3mL de disolución HEAT, se tapa el matraz y se agita vigorosamente durante 3 minutos.
3. Se agregan 2mL de disolución hidróxido de potasio al 40% y se agita suavemente

4. Se coloca el matraz en baño María a 56 °C durante 20 min, se le acopla un refrigerante al matraz para evitar la evaporación del disolvente.
5. Pasados los 20 minutos se enfría el matraz con un trapo húmedo y se le añaden 30mL de Hexano, se tapa y agita.
6. Se lleva al aforo con la disolución de sulfato de sodio al 10%, se tapa y agita durante 2 minutos.
7. Se deja en reposo hasta la clarificación de la epifase en obscuridad durante 1 hora.
8. Se determina la absorbancia de la epifase a 474nm, (La absorbancia de la muestra debe dar <1 si da más se tiene que hacer una dilución con Hexano).

Una vez obtenida la absorbancia se aplica la siguiente fórmula:

Gramos de Xantofilas Totales/Kg de Muestra:

$$\frac{Abs \times D}{g \text{ de } M \times 236}$$

Donde:

Abs: Absorbancia

D: Factor de dilución D= 50

236= Absortividad específica de la trans-luteína

g de M: gramos de la muestra

$$\frac{(.169)(50)}{(0.2)(236)} = 0.16 \frac{g}{Kg} \text{ de extracto}$$

Por último se mide el volumen total de la extracción (parte de arriba) y se guarda en frascos ámbar.

## Apéndice 12

### Cuantificación de la proporción de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Este método se utiliza para cuantificar la proporción de xantofilas totales en pigmentos, la separación se basa en la migración diferencial debida a la polaridad de la molécula y la detección por la absorbancia de la molécula.

#### Muestra de pigmentos

Se pesan 200mg de pigmentos (extracto) y se colocan directamente en el matraz aforado de 100mL ámbar.

#### Disolución extractora HEAT

Se prepara con Hexano:Etanol absoluto:Acetona:Tolueno en proporción (10:6:7:7) para preparar 30 mL.

#### Disolución acuosa de sulfato de sodio al 10%

Se pesan 5g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se disuelve en 50 mL de agua destilada

#### Disolución de Hidróxido de potasio al 40%

Se pesan 2g de KOH y se disuelve en 5 mL de Metanol grado HPLC

#### Blanco

Se prepara una disolución HEAT:Hexano (1:1),  
HEAT: (1000 $\mu$ L:600 $\mu$ L:700 $\mu$ L:700 $\mu$ L), Hexano (3mL)

#### Trizma Base

Se pesa 0.1211 de Trizma Base y se afora a 10 mL de agua destilada

#### Fase Móvil

Disolvente A: Acetonitrilo:Metanol:Tris HCl 0.1M pH8 (72:8:3)

Disolvente B: Metanol:Hexano (40:10)

En ambos casos se prepara el doble de A y B.

### **Preparación de la extracción**

1. Se pesa una muestra de 200mg de pigmentos y se colocan directamente en el matraz aforado de 100mL ámbar.
2. Se añaden 3mL de disolución HEAT, se tapa el matraz y se agita vigorosamente durante 3 minutos.
3. Se agregan 2mL de disolución hidróxido de potasio al 40% y se agita suavemente
4. Se coloca el matraz en baño María a 56 °C durante 20 min, se le acopla un refrigerante al matraz para evitar la evaporación del disolvente.
5. Pasados los 20 minutos se enfría el matraz con un trapo húmedo y se le añaden 30mL de Hexano, se tapa y agita.
6. Se lleva al aforo con la disolución de sulfato de sodio al 10%, se tapa y agita durante 2 minutos.
7. Se deja en reposo hasta la clarificación de la epifase en obscuridad durante 1 hora.
8. Se inyectan 30 µL de la parte de arriba en el cromatógrafo de líquidos

Para las condiciones del HPLC se coloca la columna ODS-1-5 µ leght 250mm/400mm  
Con la fase móvil se mantiene a flujo a 2 mL/min.

**Condiciones de polaridad:** se mantiene el disolvente A durante 5 minutos posteriormente a 7.5 minutos, pasar a 100% del disolvente B y mantenerlo durante 7.5 minutos.

La longitud de onda del detector fija a 440nm

Detector DAD barrido de 200 a 600 nm.

El tiempo de la corrida es de 15 minutos por cada muestra de pigmentos.

## Apéndice 13

### **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

En cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Cromatógrafo de Gases Modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C, Marca Agilent Technologies.

Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película.

#### **Condiciones de corrida para las fracciones (método hexánico):**

- Temperatura del inyector: 250°C.
- Modo de inyección: Split.
- Radio: 33.5:1
- Purga de flujo del Split: 29.9 mL/mn.
- Flujo de corrida: 35 cm/seg

#### **Horno:**

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 21.67 minutos.
- Línea de transferencia: 290°C.

**Detector del Espectrómetro de Masas:**

- Método de adquisición de datos. Full Scan.
- Rango de masas: 35-600 m/z.
- Temperatura del cuádrupolo: 150°C.
- Temperatura de la fuente de ionización: 230°C.
- Impacto electrónico: energía de 70 eV

## Apéndice 14

### Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

(Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002).

Este método es ampliamente usado para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes de productos naturales (Gurib-Fakim, 2006). Es un tipo de cromatografía en columna, se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Los elementos que participan en la interacción en un HPLC son: fase móvil, fase estacionaria y la muestra.

En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presenta pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasa mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluído de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

El extracto metanólico y las fracciones activas se analizarán por HPLC, con las siguientes condiciones:

Columna Discovery C-18 de 250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm.

Extracto metanólico: Se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25:25:50).

Fracciones activas: se corrió con una mezcla de MeOH-acetonitrilo- $\text{H}_2\text{PO}_4$ - $\text{H}_2\text{O}$  (25:25:0.1:50).

Flujo de 1 mL/min.

Detector de arreglo de diodos (DAD)

Longitud de onda de 260nm, realizando un barrido completo de 200-400 nm.

## Apéndice 15

### **Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM)**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica de separación de sustancias más ampliamente utilizada. Los sistemas HPLC-MS facilitan el análisis de muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar por GC-MS es decir, analitos poco volátiles. Como resultado, la técnica es ampliamente utilizada en el análisis de fármacos, proteínas, entre otros.

Los sistemas de ionización que han hecho posible este desarrollo son los sistemas API-EI y APCI. De esta forma se pueden analizar compuestos de peso molecular de hasta 100kDa, con un rango de polaridades que va desde analitos no polares hasta los muy polares.

La LC-MS (por sus siglas en inglés) combina el poder de separación de los materiales de gran peso molecular de la HPLC y la capacidad de detección selectiva y confirmación de la identidad molecular del espectrómetro de masas.

La LC-MS utiliza un sistema HPLC pero, en el punto en el que las fases móviles de líquidos abandonan la columna, la muestra líquida es rociada para producir microgotas. Estas se evaporan rápidamente, liberando moléculas de analito ionizadas que, a continuación, pueden separarse en el espectrómetro de gases.

Los espectros de masas obtenidos por HPLC-MS suelen ser más sencillos que los obtenidos en GC-MS debido a que el nivel de fragmentación de las moléculas es menor. El inconveniente es que los espectros dependen parcialmente de los parámetros de ionización, es decir, que no pueden ser considerados como “huella dactilar” del compuesto y, por tanto, la comparación con colecciones de espectros estándares no es posible. Por esta razón, la comparación del espectro de masas de analitos con patrones debe realizarse en las mismas condiciones de trabajo.

En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presentará pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasará mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra que se analizará será introducida y sus componentes se retrasarán diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que se adelantarán por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra dependerá de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tardará un compuesto a ser eluído de la columna se denominará tiempo de retención y se considerará una propiedad característica que identificará a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementará la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reducirá así su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

Se efectuó el análisis de las muestras, mediante perfiles cromatógraficos, en HPLC acoplado a un espectrómetro de masas, para ello se empleó un equipo Infinity de los cuales la columna e inyector eran del modelo 1269 y la columna 1290, el espectrómetro de masas Agilent Technologies 6230TOF. Para este fin, se empleó una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150x2.1mm)(Phenomenex) y una fase móvil en gradiente de dos líneas (A y B), A=Agua grado HPLC-Acetonitrilo (90:10), B=Metanol grado HPLC-Acetonitrilo (90:10) y a ambas se les agrega 0.1%de ácido fórmico. El cromatograma fue comparado con los estándares.

## REFERENCIAS

- Aitim, 2011. Madera en rollo. Asociación de Investigación Técnica de las Industrias de la Madera. Consejo Superior de Arquitectura. Madrid. España. 1 – 3.
- Aqeel, A., Khursheed, A. K., Viqaruddin, A., Sabiha, Q., 1989. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. *Arzneimittelforschung*. 39: 652 – 655.
- Arango, A. G. J., 2008. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquía. Medellín. Colombia. 3 – 84.
- Ardoino, S. M., Boeris, M. A., Baruta, D. A., Toso, R. E., 2012. Comparación del efecto antimicrobiano de partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* sobre *Brucella canis*. CIDEF - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, República Argentina. *Ciencia Veterinaria*. 14(1): 7 – 13.
- Ardoino, S. M., Boeris, M. A., Toso, R. E., 2013. Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. CIDEF - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, República Argentina. *Ciencia Veterinaria*. 15 (1): 115 – 125.
- Bazán, L. R., 2012. El mezquite previene la diabetes. Periódico El decididor. Tamaulipas. México. 1-4.
- Beer, E. J., Sherwood, M. B., 1945. The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances. *The welcome research laboratories*. 459-467.
- Borbolla, S. M. E., Vidal, P. M. R., Piña, G. O. E., Ramírez, M. I., Vidal, V. J. J., 2004. Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. *Salud en Tabasco*. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco, Villahermosa, México. 10 (2): 221-232.
- Canales, M. M., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo de Vivar, R. A., Durán, D. A., Lira, S. R., 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75: 21-43.

- Castro, G. M. I., 2002. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. Interciencia. Caracas Venezuela. 27 (3): 128 – 136.
- Castillo, G. D., Woolrich, Z. N. L., 2009. Identificación química de compuestos fenólicos por cromatografía de HPLC con detector uv de extractos etanólicos de propóleos recolectados en la zona Córdoba-Orizaba. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Orizaba, Veracruz. 1 – 100.
- Cervantes, R., Concepción, M., 2002. Plantas de importancia económica en las Zonas Áridas y Semiáridas de México. Primera edición. México D.F. 53 – 62.
- Cole, M. D., 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays - a critical review. Biochemical Systematic and Ecology. 22 (8): 837 – 856.
- CONAZA E INE., 1994. El mezquite *Prosopis sp.* Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Todos Santos. 52.
- Corzo, A. G., Bravo, E., Serrano F., Vattuonez, M. A., 2009. Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a cepas patógenas humanas y fitopatógenas. Revista de Ciencias Forestales – Quebracho, Argentina 17 (1,2): 106 – 114.
- Cruz, S. J. S., 2007. Más de 100 Plantas Medicinales. Medicina Popular Canaria. Primera edición. Las Palmas Gran Canaria, España. 17 - 38.
- Dávila, P., Lira, R., 2002. La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. T015. México D.F.
- De La Torre-Almaraz, R., 2009. Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México. Agrociencia. 43 (2): 197 – 208.
- Domingo, D., López-Brea, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia 16 (4): 385 – 393.
- Dorais, M., Papadopoulos, A. P., Groselin, A., 2001. Greenhouse tomato fruit quality. Horticultural Reviews. 26: 239 – 319.

- Encarnación, D. R., 2010. Importancia y potencial de la medicina tradicional de México. *Ciencia, Tecnología e Innovación para el Desarrollo de México*. 2 (44): 1.
- Esquivel, G. E. R., Noriega, C. R., Bello, G. M. A., Saavedra, M. A., Salgado, G. R., 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. 14(1): 45 – 52.
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspective* 109: 69 – 75.
- Fernández, B. Ma. N., 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 98.
- Franco, B. M., 2014. Actividad antimicrobiana de la fibra del “Pochote”, *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 101.
- Frías-Hernández, J. T., Olalde-Portugal, V., Vernon-Carte, E. J., 2000. El mezquite. Árbol de usos múltiples: estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato, México. 247.
- Flores, T. F. J., 1993. Atributos ecológicos y aprovechamiento del mezquite. *Revista Investigación y Ciencia Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 9 (3): 24 – 30.
- Flores, N., 2011. Malinalli – Herbolaria Médica (15\_04\_11). Nutrición y medicamentos herbarios. Guatemala. Disponible en: <http://malinalli-herbolariamedica.blogspot.mx/>
- Gallegos, I. N. E., Rocha, G. R. F., González, L. M. A., García C., 2013. Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*), *CyTA - Journal of Food*, 11 (2): 162 – 170.
- García, E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Adaptado para las Condiciones de la República Mexicana. 3ª Ed. Offset., Lario Ed. S.A. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 3: 252.

- García, A. E., Martínez, J. O. A., Torres, N. S. y Frías, H. J. T. 2000. Escarificación biológica de semilla de mezquite [*Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C. Johnst.] con diferentes especies de ganado doméstico. Universidad de Guanajuato México. 117 – 123.
- García, S., Alarcón, G., Rodríguez, C., Heredia, N., 2006. Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludovisiana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 669 – 674.
- Geetha, R. V., Roy, A., Lakshimi, T., 2011. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of heart wood extract of *Acacia catechu* on enteric pathogens. International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research 9 (2): 147 – 149.
- Gibson, S., 2002. Mesquite: las plantas medicinales del Sudoeste. Disponible en: <http://medplant.nmsu.edu/mesquite4.htm>.
- Gimeno, C. E., 2004. Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM. 23 (6): 80 – 84.
- Gómez, L. L., Espino, C. C., Guerrero, D. L. E., Morán, P. J., López, P. J. L., Montenegro, N. G., Olmedo, A. D., Gupta, M. P., 2014. Cribado de la actividad antimicrobiana de plantas panameñas de la familia *Fabaceae*. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica. 8 (2): 11 – 23.
- Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes, A. M., Burton, G., 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 25 – 31.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27: 1 – 93.
- Gutiérrez, A., D., Ortiz, G.C., Mendoza, C., A., 2008. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. 1 – 5.
- Gutiérrez, M. A., 2002. Café, Antioxidantes y protección a la Salud. MEDISAN. 6 (4): 72 – 81.
- Haro, A. M., Artacho, R., Cabrera-Vique, C., 2006. Ácido linoleico conjugado: interés actual en nutrición humana. Medicina Clínica. 127 (13): 508-15.

- INECOL, SEMARNAT, 2007, Vaina de mezquite: usos y propiedades. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/72/usos.html#top>
- Jiang, H., Liang, C., Liu, X., Jiang, Q., He, Z., Wu, J., Pan, X., Ren, Y., Fan, M., Li, M., Wu, Z., 2010. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis* 210 (1): 71 – 77.
- Kalita, P., Barman, T. K., Pal, T. K., Kalita, R., 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 3 (4): 33 – 37.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Sommers, H. M., 1985. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México. 909.
- Kumar, P. P., Kumaravel, S. y Lalitha, C., 2010. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal Biochemistry Research* 4 (7): 191 – 195.
- Menéndez, S. A., 2012. Efectos vasculares de la quercetina y la catequina: interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Farmacología. Tesis Doctoral. 1 – 147.
- Martínez, F. S., González, G. J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17: (6) 271 – 278.
- Martínez, M. A., 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. 1 – 74.
- Martínez, M. M., Ocampo, M. D., Galvis, H. J, Valencia A., 2011. Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16 (4): 313 – 323.
- Mata, S., Zolla, C., Arguete, A., 2009. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, Tomado el 10 de Enero del 2016. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G., 2002. Bioquímica. 3a edición Addison Wesley. España. 166 – 170.

- Medina, S. J., 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Licenciatura Biología. UNAM, Facultad de Ciencias, México. 35.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology* 26 (2): 211 – 219.
- Mothana, R. A. A., Abdo, S. A. A., Hasson, S., Althawab, F. M. N., Alaghbari, S. A. Z, Lindequist, U., 2008. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *eCAM* 7 (3): 323 – 330.
- Moore, M., 1989. Las plantas medicinales de la barranca del desierto del oeste. Museum of New Mexico Press. Santa Fe, Nuevo México. 175.
- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M., Takatsuki, A., 1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of VATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell Structure and Function* 18: 139 – 149.
- Niño, J., Correa Y. M., Mosquera, O. M., 2006. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombia Biodiversity. *Pharmaceutical Biology*. 44 (1): 14 – 18.
- Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (*Boraginaceae*). *Journal of Ethnopharmacology* 112: 476 – 481.
- Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional., 2008. Tomado el 9 de noviembre 2015. Disponible en: [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/es/index.html](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/index.html)
- Palacios, R. A., 2006. Los Mezquites Mexicanos: Biodiversidad y distribución geográfica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 41 (1-2): 99 – 121.
- Picazo, J. J., 2000. 11.- Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 1 – 54.

- Pérez, T. G., 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana de Investigación Biomédica. 22 (1) 48 – 57.
- Prieto, R., J. A., Mata, R. S., Sigala R. J. A., Madrid, A. R. E., Mejía B. J. M., 2013. Producción de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl ex Wild.) M. C. Johnst. con diferentes mezclas de sustrato. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 4 (20): 50 - 57.
- Quesada, H. A., 2008. Las plantas medicinales. Revista Biocenosis 21: 25 – 28.
- Ramamoorthy, P. K., Bono, A., 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): 70 – 80.
- Ramírez, V. O., 2012. Medicina Tradicional una Responsabilidad Social Nacional. VI Encuentro Nacional de Bioética. Instituto de Salud del Estado de México. Secretaría de Salud. 1 – 21.
- Reynaldo, I., Cartaya, O., 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 22 (2): 5 – 14.
- Rodríguez, L. M. G, 2014. Estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto de *Bursera aptera* Ramírez. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México.
- Rodríguez, S. E. N., Rojo, M. G. E., Ramírez, V. B., Martínez, R. R., Cong, H. M. C., Medina, T. S. M., Piña, R. H. H., 2014. Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd.) en México. Ra Ximhai. Edición Especial Universidad Autónoma Indígena de México Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. 10 (3): 173 – 193.
- Roldán, M. M. T., 2004. Patrones demográficos de *Prosopis laevigata* en un ambiente fragmentado del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, México. 46.
- Romero, de la F. I., 2009. Metabolismo de los fenilpropanoides y proteínas relacionadas con la patogénesis en el mecanismo de respuesta de uva de mesa ("*Vitis Vinifera*" L. Cv. cardinal) a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> y bajas temperaturas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad De Ciencias Biológicas. 1 – 254.

- Rosas, L. R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, México. 94.
- Rzedowski, J., 1988. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. 417.
- Saeed, N. M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H. M., Algandaby, M.M., Al-Abbasi, F. A., Abdel- Naim, A.B., 2012. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and applied pharmacology* 264 (1): 84 – 93.
- Salazar, F. R., 1998. *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. 1825. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 39: 5.
- Salcedo-Sánchez, B., 1996. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de licenciatura, Biología, UNAM. Facultad de Ciencias 6 – 10.
- Salud-Pérez, G., Zavala, M. A., Arias L, Pérez, C., Pérez, R. M., 2007. Antimicrobial study of bark from five tree species. *Phytotherapy Research* 15 (4): 356 – 359.
- Sánchez, L., Neira, A., 2005. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. Cultura Científica. Fundación Universitaria Juan de Castellanos. Tunja Boyacá. Colombia. 3: 40 – 45.
- Sánchez, O. P. M., 2008. Efecto de la época de transplante sobre la acumulación de luteína en inflorescencias de cempaxúchil (*Tagetes erecta* L.). Tesis de maestría, Maestro en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec. Morelos. 85.
- Sánchez, E., 2012. Efecto de compuestos fitoquímicos sobre microorganismos de importancia en alimentos. Tesis de Doctorado, Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma De Nuevo León. Facultad De Ciencias Biológicas. México. 50.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152 – 178.

- UdelaR. Temas de Bacteriología y Virología Médica [en línea]. 2008. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. 3ª Edición. 23 – 42. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/cefaed2006.htm>. [Fecha de consulta: 27 de Abril de 2016]
- Toso, R. E., Poblete, G., Boeris, M. A., 2012. Efecto de *Prosopis flexuosa* DC. var. *flexuosa* (“algarrobo”) sobre la motilidad gastrointestinal. CIDEF - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Ciencia Veterinaria. General Pico - La Pampa, República Argentina. 14 (1): 54 – 61.
- Trapero, Q. Y. M., 2013. Farmacocinética Y Toxicología del 4-Hidroxi-3-Metoxibenzaldehído (Vainillina) en modelos *In Vivo*. Universidad de Oriente. Centro de Biofísica Médica. La Habana. 1 – 158.
- Valiente, B. L., 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 65.
- Valiente, B. A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores, H. N., Arizmendi, M. C., Ortega R. J., Soriano, J. A., 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México 67: 25 – 75.
- Vanden, B. D. A., Vlietinck, A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Methods in plant biochemistry. "Assays for Bioactivity". Hostettmann, K. Series editor Dey, P. M. Academic Press. New York, USA. 6: 47 – 71.
- Varas, P. D., 2004. Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC. Tesis Doctoral. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Valdivia, Chile. 1 – 55.
- Zamacona, M. X. D., Castro, D. E., 2010. Identificación y obtención de alcaloides en variedades de mezquite (*Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida*). 12º Verano de la Ciencia de La Región Centro. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 1 – 4.
- Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H., Kim, W. G., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. Federation of European Biochemical Societies 579: 5157 – 5162.

