



---

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Dalea carthagenensis***

**(Jacq.) J.F. Macbr.**

T E S I S

Para obtener el título de:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

**Montes de Oca Márquez Carolina**

**Director de Tesis:**

**Dra. Serrano Parrales Rocio**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. 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.

Proyecto realizado en el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA204915, UNAM DGAPA.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UBIPRO y al Laboratorio de Farmacognosia.

A mi asesora Dra. Rocio Serrano Parrales, por el tiempo, la paciencia, por todos los conocimientos aportados y sobre todo por el cariño con que me ayudó a alcanzar esta meta, porque además de ser una excelente profesora, encontré una amiga muy querida.

A mis sinodales:

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado

Dra. Ana María Bores García

Mtra. Julieta Orozco Martínez

Por el tiempo que me dedicaron, por estar pendientes de mi formación, por sus valiosos conocimientos, la dedicación y el cuidado que me tuvieron a lo largo de este proyecto.

Y a Héctor Cervantes Maya, por los conocimientos aportados.

## *Dedicatoria*

*A mi madre: Francisca Montes de Oca*

*Porque has estado conmigo en todo momento, has creído en mí más que yo misma y me has dado todo tu cariño incondicionalmente. Por darme la vida y hacer de ella una maravillosa experiencia. Porque sin ti, no sería ni la mitad de lo que ahora. Este logro es para ti.*

*Te quiero muchísimo mamá.*

*“Hay quienes traen al mundo una luz tan grande que incluso después de haberse ido esa luz permanece”.*

*En memoria de*

*Gustavo López Moreno*

## **Agradecimientos**

A mi familia, mis abuelitos Juana y René, mis tíos Mercedes, Amalia, Cristina y Jacinto, a mis primos y a Sergio por ayudarme a estudiar artrópodos día y noche. A mi mamá Lety porque me apoyaste y me diste todo lo que necesitaba. Los quiero mucho, son una gran parte de mi vida.

A mis amigos de fitoquímica: Zule, Andrea, Caro, Alfonso, Dianita, Montse, Gustavo y Cristi, porque además de sus conocimientos, me dieron momentos muy agradables y muchas risas, porque esos desayunos e intercambios en febrero fueron de los momentos más bonitos en el laboratorio. Más que compañeros, nos hicimos buenos amigos.

A mis amigas de la carrera: Perla y Metzin, por ayudarme con mis conteos infinitos de bacterias... ¡en viernes!. Por estar a mi lado en los momentos buenos y malos, por impulsarme, por escucharme y hacerme reír, por ser ustedes, por estar a mi lado. Son mis mejores amigas. Las quiero mucho.

A quienes estuvieron desde el inicio: Vicky e Iván Vázquez, porque me animaron a seguir.

Y a Lola, por mostrarme la biología.

*“En la vida uno debe hacer lo que le da la gana, porque la frase que comienza con ‘hubiera querido’ vale para nada”.*

*Leonora Carrington*

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>OBJETIVOS</b> .....	7
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
1. Colecta.....	8
2.Obtención de los extractos .....	8
3.Determinación de la composición química general de los extractos.....	8
4. Actividad antimicrobiana .....	9
4.1. Actividad antibacteriana.....	9
4.2. Actividad antifúngica .....	11
5. Análisis estadísticos .....	12
<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....	13
1. Datos etnobotánicos de la especie.....	13
2. Extracción .....	13
3. Determinación de la composición química de los extractos.....	14
3.1. Pruebas cualitativas.....	14
3.2 Cromatografía (CG-MS).....	14
4. Actividad antimicrobiana .....	16
4.1 Actividad antibacteriana.....	16
4.2 Actividad antifúngica.....	19
<b>DISCUSIÓN</b> .....	28
<b>CONCLUSIONES</b> .....	33
<b>APÉNDICES</b> .....	34
Apéndice 1.....	34
Apéndice 2.....	35
Apéndice 3.....	35
Apéndice 4.....	38
Apéndice 5.....	39
Apéndice 6.....	39
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Estudios sobre las propiedades antimicrobianas de algunas especies del género <i>Dalea</i> .....	5
<b>Cuadro 2.</b> Reacciones de identificación de grupos de metabolitos secundarios en los extractos de <i>D. carthagenensis</i> .....	8
<b>Cuadro 3.</b> Ficha técnica de <i>D. carthagenensis</i> .....	13
<b>Cuadro 4.</b> Rendimiento de los extractos de flores y tallos.....	13
<b>Cuadro 5.</b> Grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de <i>D. carthagenensis</i> .....	14
<b>Cuadro 6.</b> CMI y CBM de los extractos de flores (bacterias).....	18
<b>Cuadro 7.</b> CMI y CBM de los extractos de tallos (bacterias) .....	19
<b>Cuadro 8.</b> Actividad antifúngica de los extractos de flores (levaduras) .....	21
<b>Cuadro 9.</b> Actividad antifúngica de los extractos de tallo (levaduras).....	22
<b>Cuadro 10.</b> Actividad antifúngica de los extractos (hongos filamentosos).....	23
<b>Cuadro 11.</b> Concentración fungicida media (CF <sub>50</sub> ) de los extractos de <i>D. carthagenensis</i> sobre hongos filamentosos. ....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Dalea carthagenensis</i> (Jacq.) J.F. Macbr. ....	6
<b>Figura 2.</b> Cromatogramas obtenidos por CG-MS de los extractos hexánicos de flores (a) y tallos (b) de <i>D. carthagenensis</i> . ....	15
<b>Figura 3.</b> Actividad antibacteriana de los extractos de flores (a) y tallos (b) de <i>D. carthagenensis</i> . ....	17
<b>Figura 4.</b> Actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes de los extractos de flores (a) y tallos(b) de <i>D. carthagenensis</i> .. ....	20
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto hexánico de flores (a) y de tallos (b) de <i>D. carthagenensis</i> . ....	25
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto acetónico de flores (a) y de tallos (b) de <i>D. carthagenensis</i> . ....	26
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de flores (a) y de tallos (b) de <i>D. carthagenensis</i> . ....	27
<b>Figura 8.</b> Ubicación San Rafael, Coxcatlán en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán .....	34

## RESUMEN

La sociedad humana, ha acumulado conocimientos tradicionales sobre el uso de las plantas como medicinas, siendo estas el recurso material más amplio y valioso de la medicina indígena su estudio es fundamental en la historia de México. Dentro de esta riqueza se encuentra el género *Dalea*, del cual se ha reportado la capacidad de potenciar la actividad antimicrobiana. Sin embargo, todavía hay especies de las cuales no se han realizado estudios al respecto, tal es el caso de *Dalea carthagenensis*, conocida comúnmente como “escobilla”, que es utilizada como antiinflamatorio y contra infecciones gastrointestinales en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana diferencial de flores y tallos de dicha especie a partir de extractos de distinta polaridad. Se obtuvieron los extractos hexánico, acetónico y metanólico diferenciales de flores y tallos, mediante el método de maceración y destilación a presión reducida. Se evaluó la actividad antibacteriana y antimicótica cualitativamente mediante el método Kirby-Bauer e inhibición de crecimiento radial y cuantitativamente por dilución en agar. La contribución química de la especie se realizó por pruebas cualitativas para fenoles, terpenos, alcaloides, taninos, glucósidos y saponinas. Como resultado se obtuvo que *D. carthagenensis* mostró actividad antimicrobiana sobre bacterias, hongos levaduriformes y miceliados. Los extractos hexánicos mostraron la mayor actividad, al presentar inhibición en un mayor número de microorganismos. La cepas más susceptibles al extracto hexánico de flores fueron: *Staphylococcus aureus* (Concentración Mínima Inhibitoria de 0.125mg/mL y Concentración Bactericida Mínima de 0.25 mg/mL), *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (CMI de 0.125 mg/mL y CBM de 0.25 mg/mL). *Trichophyton mentagrophyes* fue la cepa más susceptible a los extractos hexánico y acetónico de flores y tallos con una inhibición de más del 90% en el crecimiento a una concentración de 0.125 mg/mL. Las pruebas fitoquímicas cualitativas dieron positivo en saponinas, fenoles, terpenos y taninos de los extractos de flores y tallos. Los resultados explican el uso medicinal de *D. carthagenensis* sobre enfermedades de posible origen microbiano.

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen en la Tierra; se encuentran prácticamente en todas las regiones del planeta, desde los polos hasta los trópicos (Olalde y Aguilera, 1998). El grupo incluye bacterias, hongos (levaduras y filamentosos), protozoos y algas microscópicas. Aunque no todos los microorganismos son patógenos, el conocimiento sobre ellos es necesario para la medicina y otras ciencias relacionadas con la salud (Tortora *et al.*, 2007).

Las enfermedades infecciosas son, generalmente, provocadas por microorganismos que invaden el cuerpo y se multiplican. La invasión se inicia habitualmente mediante la adherencia a las células de la persona afectada. Tras la invasión, los microorganismos deben reproducirse para producir la infección. Muchos de los microorganismos causantes de enfermedades tienen propiedades que aumentan la gravedad del proceso y resisten a los mecanismos de defensa del cuerpo (Merck y Dohme, 2013).

El tratamiento habitual ante infecciones microbianas son los antibióticos, los cuales tienen diversos mecanismos de acción interfiriendo con la estructura o función de la célula bacteriana, en general existen cuatro mecanismos de acción antimicrobiana (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Crowley, 2014):

- 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular o daño en sus componentes estructurales. Algunos ejemplos son fosfomicina, bacitracina, los  $\beta$ -lactámicos y glucopéptidos.
- 2) Inhibición de las funciones de la membrana celular, lo que interfiere con su permeabilidad ocasionando lesión celular y muerte. Los principales derivados que afectan la membrana son las polimixinas.
- 3) Afectación en la síntesis de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, las quinolonas afectan el proceso de enrollamiento/desenrollamiento del ADN.
- 4) Inhibición de la síntesis de proteínas en diferentes fases del proceso: activación, iniciación, fijación del complejo aminoácido-ARNt al ribosoma, elongación, algunos ejemplos de antibióticos que interfieren con la síntesis de proteínas son los amonoglúcidos, las tetraciclinas y los macrólidos.

Otra alternativa terapéutica en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias es el uso de plantas medicinales. La sociedad humana ha acumulado conocimientos tradicionales sobre su uso. Hasta el advenimiento de la medicina moderna el ser humano dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades y las de los animales. Aproximadamente el 80 % de la población de los países en desarrollo usan la medicina tradicional derivada de plantas para tratar enfermedades (Zambrana, 2005), entre ellas las de origen microbiano.

Los datos sobre las formas de uso, propiedades terapéuticas, recolección y comercio de numerosas plantas se han acumulado en distintas fuentes a través de la historia de la humanidad, tales como los códices precolombinos, las crónicas y relaciones coloniales. Las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina indígena, su estudio es fundamental en la historia de México gracias a la enorme riqueza cultural y florística que este posee (BDMTM, 2009).

Las plantas medicinales se definen como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden actuar como precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Lorraine y Mendoza, 2010).

México, junto con China, India, Colombia y Perú se encuentra entre los cinco países llamados “megadiversos”, los cuales en conjunto albergan entre el 60 y 70% de la diversidad biológica conocida del planeta. Nuestro país se caracteriza por estar compuesto de un gran número de especies endémicas (Conabio, 2008).

La riqueza florística de las angiospermas en México se reporta con la presencia de dos subclases, 75 órdenes y 248 familias que ubican a nuestro país dentro de los cinco primeros lugares en diversidad de plantas a nivel mundial, con 22,259 especies (Villaseñor y Ortiz, 2014).

Dentro de esta riqueza se encuentra la familia Fabaceae, la cual posee numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en la corteza, las hojas y la raíz. De esta familia se han reportado alcaloides, flavonoides y polifenoles. La

bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas está asociada a su efecto antidiabético, antiinflamatorio y antimicrobiano (Martínez *et al.*, 2011).

La Familia Fabaceae incluye al género *Dalea*, que crece exclusivamente en el continente Americano e incluye más de 250 especies. Su hábitat se extiende desde el oeste de Estados Unidos hasta la región central de Argentina y Chile (Peralta *et al.*, 2013), de las cuales se ha reportado que poseen la capacidad de reforzar la actividad antimicrobiana (Belofsky *et al.*, 2006<sup>1</sup>), efecto que se encuentra documentado por la comunidad científica, ya que se han hecho estudios en los que se ha corroborado la actividad antimicrobiana de especies representativas del género (cuadro 1). Sin embargo, hay especies de las cuales no se han realizado estudios al respecto, tal es el caso de *D. carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr, conocida comúnmente como “escobilla” (Figura 1) y de la cual solo se ha reportado que una fracción polar posee efecto citotóxico (CI<sub>50</sub> sobre líneas celulares kB (Ankli *et al.*, 2002).

*D. carthagenensis* es una especie herbácea nativa de América, se extiende desde el oeste de Estados Unidos hasta la región central de Chile (UNIBIO, 2010), es utilizada en Yucatán se utiliza para tratar enfermedades dermatológicas y para aliviar heridas causadas por animales venenosos; en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla) se emplea en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y en Zapotitlán Salinas la infusión se emplea como antidiarreico y para controlar el asma, la artritis reumatoide y la colitis.

**Cuadro 1. Estudios sobre las propiedades antimicrobianas de algunas especies del género *Dalea*.**

Referencia	Especie de estudio	Aportación
Nanayakkara <i>et al.</i> , 2002	<i>Dalea scandens</i> var. <i>paucifolia</i>	Aislaron nuevos flavonoides, tres de ellos mostraron actividad significativa contra <i>Staphylococcus aureus</i> .
Pérez <i>et al.</i> , 2003	<i>D. elegans</i>	A partir de bioensayos demostraron la actividad antibacteriana sobre <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> y una cepa de <i>Trychophyton mentagrophytes</i> , que eran cepas multirresistentes aisladas de casos clínicos
Belofsky <i>et al.</i> , 2004.	<i>D. versicolor</i>	Evaluaron la actividad de la especie sobre una variedad de organismos <i>in vitro</i> , incluyendo las bacterias Gram-positivas <i>S. aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i> . Además, los compuestos se evaluaron por su capacidad para potenciar la actividad de los antimicrobianos conocidos a través de la inhibición de la multirresistencia.
Belofsky <i>et al.</i> , 2006 <sup>1</sup>	<i>D. spinosa</i>	Aislaron componentes fenólicos y evaluaron la actividad antimicrobiana, mostrando un incremento en el efecto antibacteriano contra <i>S. aureus</i> .
Belofsky <i>et al.</i> , 2006 <sup>2</sup>	<i>D. aurea</i>	Probaron la actividad del extracto metanólico demostrando una actividad significativa <i>in vitro</i> contra la ameba <i>Naegleria fowleri</i> .
Peralta <i>et al.</i> , 2012	<i>D. elegans</i>	Realizaron un estudio donde evaluaron la actividad antimicrobiana del flavonoide prenil-pinocembrin presente en la parte aérea de la especie. Evaluaron su actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i> . Concluyeron que este compuesto revierte la resistencia a fluconazol.
Castro, 2013.	<i>D. mutissi</i>	Determinó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas y flores. Concluyó que ambos extractos, incluyendo la mezcla de los mismos, presentan actividad antimicrobiana sobre <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i> .
Belofsky <i>et al.</i> , 2014.	<i>D. searlsiae</i>	A partir del extracto metanólico, hicieron ensayos antimicrobianos, obteniendo actividad significativa sobre <i>S. mutans</i> y <i>B. cereus</i> .



**Figura 1. *Dalea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr.**  
(Imágenes tomadas de Fairchild Tropical Botanic Garden, 2007)

## HIPÓTESIS

El género *Dalea* está conformado por diversas especies poseedoras de metabolitos secundarios tales como flavonoides, polifenoles y alcaloides a los cuales se les atribuyen diversos efectos, dentro de ellos las propiedades antibacteriana y antifúngica. Además, la especie *D. carthagenensis* es utilizada en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. De acuerdo con esta información, se espera que la especie muestre actividad antimicrobiana.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- ✚ Evaluar la actividad antimicrobiana diferencial de las flores y tallos de *D. carthagenensis*.

### Objetivos particulares

- ✚ Obtener los extractos hexánico, acetónico y metanólico de flores y tallos de *D. carthagenensis*.
- ✚ Determinar cualitativamente la composición química general de los extractos.
- ✚ Evaluar cualitativa y cuantitativamente la actividad antimicrobiana de los extractos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Colecta

La planta se colectó en el mes de febrero de 2015, en el Municipio de San Rafael, Coxcatlán, Puebla (18° 12' y 18° 14' de LN; 97° 07' y 97° 09' de LO; altitud 957 m), localidad perteneciente al Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Se depositó un ejemplar de la especie en el herbario IZTA de la FES (Voucher No. HCM341) (Apéndice 1).

### 2. Obtención de los extractos

Las estructuras de la parte aérea de la planta fueron separadas en tallos (incluyendo las hojas) y flores, posteriormente se obtuvieron los extractos de diferente polaridad (hexánico, acetónico y metanólico) mediante el método de maceración (Domínguez, 1973), a partir del material vegetal seco y fragmentado. El extracto se filtró y el exceso de solvente se destiló a presión reducida en un rotavapor. Finalmente, se determinó el rendimiento total de los sólidos, por diferencia de peso (Apéndice 2).

### 3. Determinación de la composición química general de los extractos

#### 3.1. Pruebas cualitativas

Las pruebas cualitativas correspondientes se realizaron para determinar la presencia de saponinas, alcaloides, glicósidos, fenoles, terpenos y taninos. Las reacciones se describen en el cuadro 2 (Domínguez, 1973).

**Cuadro 2. Reacciones de identificación de grupos de metabolitos secundarios en los extractos de *D. carthagenensis***

Grupo de MS	Reactivo empleado	Prueba positiva
Saponinas	Agua destilada	Espuma persistente después de agitar (1min.)
Alcaloides	Dragendorff / Mayer	Precipitado café / lechoso
Glicósidos	Molish	Anillo morado
Fenoles	Cloruro férrico	Azul/verde
Terpenos	Vainillina y ácido sulfúrico	Azul, morado, rojo
Taninos	Cloruro férrico y reactivo de gelatina	Precipitado azul/verde oscuro

### 3.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS)

Los extractos hexánicos se analizaron mediante CG-MS para ello se empleó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850, equipado con una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm; espesor de película 0,25 mm). La temperatura de la columna fue de 325°C. La temperatura del inyector y detector fueron de 250°C y 290°C respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo a 70°C durante 2 minutos, después se programó a 270°C con una velocidad de 8°C/minuto hasta llegar a 290°C. El gas acarreador fue el helio a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto. La muestra fue inyectada manualmente tomando un volumen de 1 µL (2µg de extracto. Las áreas de los picos fueron regulados por integración electrónica. La cantidad relativa de los componentes individuales se basó en el área de los picos. El análisis de masas fue realizado en un espectrómetro Agilent Technologies 5975C. La temperatura de la columna y el inyector fueron los mismos que los de GC. Los espectros de masas se registraron a 70 eV. Los componentes del extracto fueron identificados por comparación de los espectros de masa con la librería interna de NIST08.L MassSpectral (Match ≥ 90%).

## 4. Actividad antimicrobiana

### 4.1. Actividad antibacteriana

#### a) Microorganismos utilizados

Las cepas bacterianas utilizadas en los bioensayos fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 53218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *S. aureus* ATCC 29213 (donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán), *Enterobacter aerogenes*, *S. aureus* (aislada de un caso clínico), *S. aureus* 75 MR, *S. aureus* 83 MR, *S. epidermidis*, *E. coli* 1249 MR, *E. coli* 182 MR, *E. coli* 28 MR (donadas por el Laboratorio de análisis clínicos de la FES Iztacala), *Klebsiella pneumoniae* (aislada de un caso clínico y donada por el Hospital Ángeles

Metropolitano). Estas cepas se mantuvieron a temperatura ambiente en agar Müller-Hinton (Bioxon).

### **b) Evaluación cualitativa**

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Koneman, 1991). Se emplearon placas con agar Müller-Hinton en las cuales se sembraron los inóculos bacterianos. Sobre las placas se colocaron sensidiscos impregnados con las sustancias a evaluar (extractos y controles) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se midieron los halos de inhibición en mm. Los sensidiscos para los bioensayos se impregnaron con 2 mg de cada extracto; como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol y como control negativo se emplearon discos impregnados con los solventes utilizados en la obtención de los extractos (hexano, acetona y metanol). Los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 3).

### **c) Evaluación cuantitativa**

La evaluación cuantitativa se realizó para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) mediante el método de dilución en agar (Koneman, 1991). Los extractos se incluyeron en placas con agar Müller-Hintonen a diferentes concentraciones (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL). Los inóculos bacterianos se sembraron por punteo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Para el control positivo se utilizaron diferentes concentraciones de cloranfenicol y el control negativo contuvo los solventes utilizados. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se consideró como CBM la concentración en la que ya no se presentó crecimiento bacteriano y como CMI la que antecede a CBM que presente crecimiento bacteriano en menor proporción (Apéndice 4).

## 4.2. Actividad antifúngica

### a) Microorganismos utilizados

Las cepas de hongos levaduriformes fueron: *C. albicans* ATCC 14065, *C. albicans* CUSI (aislada de un caso clínico) *C. albicans* 17 MR, *C. albicans* 18 MR (cepas donadas por el Laboratorio de análisis clínicos de la FES Iztacala), *C. albicans* cc, *C. glabrata* HA, *C. tropicalis* cc, *C. tropicalis* HA (aisladas de casos clínicos y donadas por el Hospital Ángeles Metropolitano). Las cepas de hongos filamentosos fueron: *Aspergillus niger*, *Fusarium sporotricum* (donadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la FES Iztacala), *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306 y *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112. Estas cepas se mantuvieron en agar papa-dextrosa (PDA) a 4 °C.

### b) Evaluación cualitativa

La actividad antifúngica cualitativa para hongos levaduriformes se determinó mediante el método de difusión en agar (Koneman *et al.*, 1991), de la misma forma en que se describió para las bacterias, en este caso se utilizó como medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA) y como control positivo se emplearon sensidiscos impregnados con 30 µg de Nistatina (Apéndice 3). Para los hongos miceliados se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se emplearon sensidiscos impregnados con 2 mg de extracto a probar, como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10 µL de los solventes utilizados y como control positivo se utilizaron sensidiscos con 60µg de Ketoconazol. Los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 5).

### c) Evaluación cuantitativa

La determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos se realizó para determinar la CMI, la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) y la concentración fungicida mínima (CFM). Los bioensayos sobre levaduras se realizaron de la misma forma que para las bacterias, en este caso se empleó como medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA). Para los hongos filamentosos se realizó mediante el método

cuantitativo inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002), para lo cual se utilizaron placas de 24 pozos con agar PDA en diferentes concentraciones del extracto (2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL). En el centro de cada pozo se inoculó 1mm de diámetro de micelio del hongo a probar, las placas se incubaron a  $28.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  de 24 a 72 horas, hasta que el micelio cubrió la superficie del agar en los pozos testigo. Como controles positivos se utilizaron Nistatina y Ketoconazol para hongos levaduriformes y filamentosos respectivamente; como controles negativos se emplearon placas de agar con los solventes utilizados en la extracción. La actividad fue evaluada calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo (Apéndice 6).

### **5. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos en la determinación de la actividad antimicrobiana se analizaron estadísticamente mediante ANOVA multifactorial, y un análisis de regresión lineal, este último para conocer la  $CF_{50}$ , para ello se utilizó el software Statistica versión 6.0.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 1. Datos etnobotánicos de la especie

Cuadro 3. Ficha técnica de *D. carthagenensis*

<b>Nombre científico:</b>	<i>Dalea carthagenensis</i>
<b>Nombre común:</b>	Escobilla
<b>Parte utilizada:</b>	Aérea
<b>Uso:</b>	Contra enfermedades dermatológicas y gastrointestinales, asma artritis reumatoide y colitis
<b>Forma de uso:</b>	Infusión
<b>Fecha de colecta:</b>	Febrero de 2015
<b>Zona de colecta:</b>	San Rafael Coxcatlán, Puebla
<b>Colector:</b>	Héctor Cervantes Maya

### 2. Extracción

El rendimiento de los extractos se evaluó en porcentaje, el más alto fue para el extracto metanólico de flores y tallos, con 10.72% y 7.44% respectivamente. Los extractos con menor rendimiento fueron el hexánico con 3.61% para flores y el acetónico con 0.7% para los tallos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Rendimiento de los extractos de flores y tallos de *D. carthagenensis*

Extractos	Flores		Tallos	
	(g)	(%)	(g)	(%)
Hexánico	7.57	3.61	9.17	1.17
Acetónico	19.71	9.40	5.56	0.7
Metanólico	22.47	10.72	57.93	7.44

El rendimiento fue calculado respecto con 209.5g de flores y 777.7g de tallos en peso seco.

### 3. Determinación de la composición química de los extractos

#### 3.1. Pruebas cualitativas

En las pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios se observaron ligeras diferencias en los extractos de flores y tallos; la presencia de terpenos se observó únicamente en los extractos hexánicos, la prueba de fenoles dio positivo únicamente para los extractos acetónicos y metanólicos. Además se identificaron taninos y saponinas en los extractos acetónico de tallos y metanólico de flor y tallo (Cuadro 5).

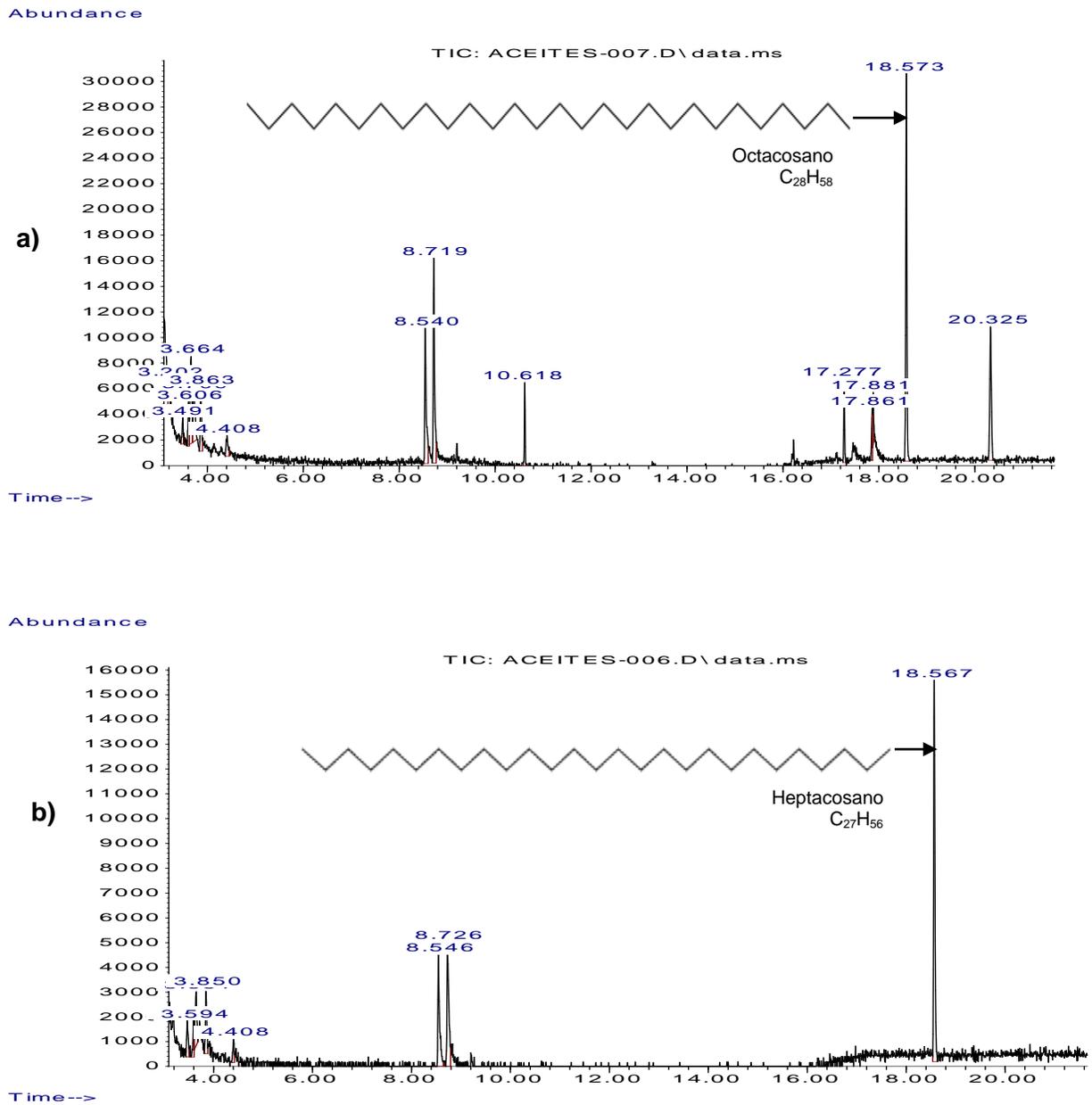
**Cuadro 5. Grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *D. carthagenensis***

Extracto		Saponinas	Alcaloides	Glucósidos	Fenoles	Terpenos	Taninos
F	Hex					●	
	Ace				●		
	Met	●			●		●
T	Hex		●			●	
	Ace	●			●		●
	Met	●			●		●

F: Flores, T: Tallos. Hex: Hexánico, Ace: Acetónico, Met: Metanólico. ●: Prueba positiva

#### 3.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS)

En los análisis por CG-MS efectuados a los extractos hexánicos, el extracto de flores mostró una mayor diversidad de compuestos en comparación con el de tallos (15 y 7 compuestos en los extractos de flores y tallos respectivamente). En ambos extractos únicamente se identificaron dos compuestos al ser comparados con la librería NIST08.L del espectro de masas (> 90%), siendo estos compuestos los más abundantes. En el extracto de flores se identificó el octacosano, que se encontró en 23.97% (Figura 2a). Por otra parte, en el extracto hexánico de tallos el compuesto más abundante fue el heptacosano, que se encontró en 40.97% (Figura 2b).



**Figura 2.** Cromatogramas obtenidos por CG-MS de los extractos hexánicos de flores (a) y tallos (b) de *D. carthagenensis*.

## 4. Actividad antimicrobiana

### 4.1 Actividad antibacteriana

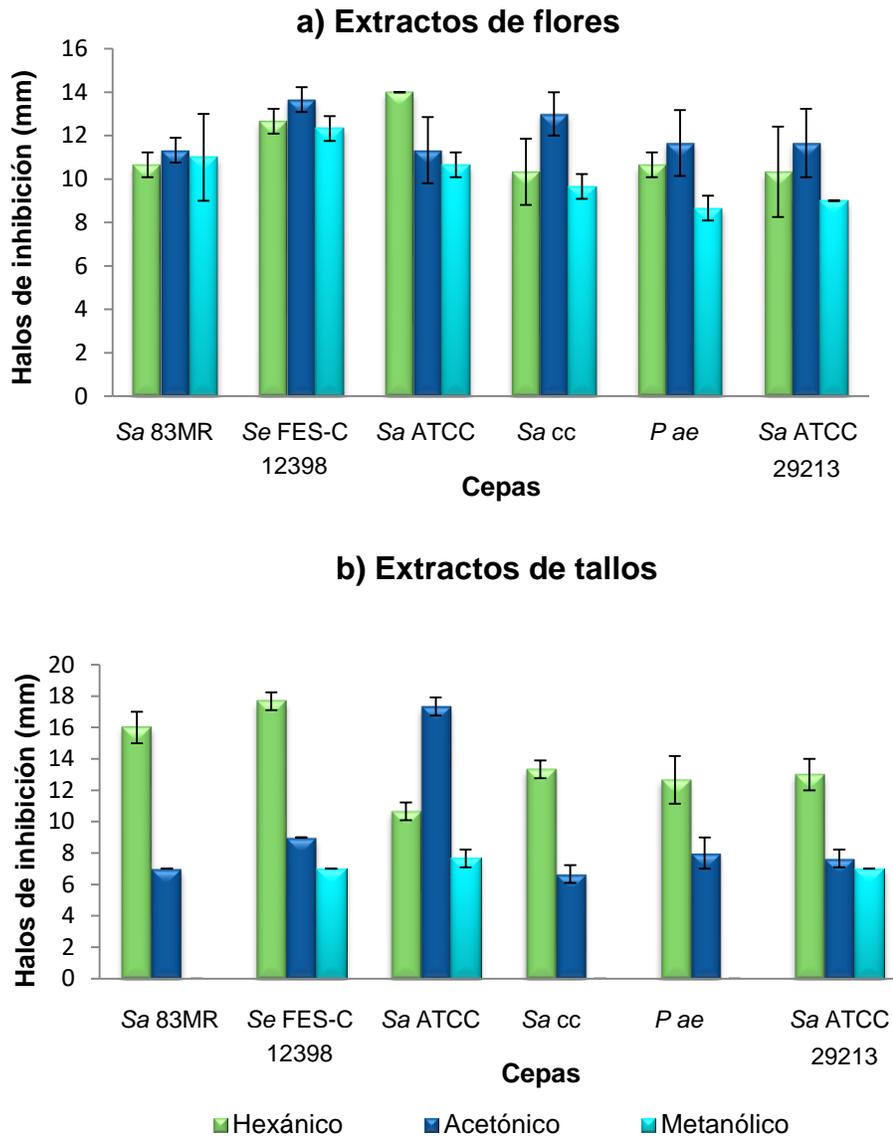
#### a) Evaluación cualitativa

Los resultados de la evaluación antibacteriana cualitativa de *D. carthagenensis* mostraron que los extractos de flores y tallos inhibieron el crecimiento de seis cepas bacterianas (figura 3). La cepa que presentó halos de inhibición en todos los extractos fue *S. epidermidis* FES-C.

Los extractos obtenidos de flores fueron los más activos, al inhibir un mayor número de cepas bacterianas en comparación con los de tallos. Las cepas más con halos de inhibición al extracto hexánico de flor fueron *S. aureus* ATCC 12398 y *S. epidermidis* FES-C con halos de inhibición de  $14.0 \pm 0.05$  y  $12.66 \pm 0.57$  mm respectivamente. Por otra parte, el extracto acetónico mostró mayor actividad inhibitoria sobre las cepas *S. aureus* cc y *S. epidermidis* FES-C, con halos de inhibición de  $13.0 \pm 1.0$  mm y  $13.66 \pm 1.52$  mm respectivamente. Con el extracto metanólico se obtuvieron halos de inhibición de  $12.33 \pm 0.57$  mm en la cepa *S. epidermidis* FES-C (Figura 3a).

En lo referente a los extractos de tallo, el extracto hexánico mostró actividad inhibitoria sobre un mayor número de cepas bacterianas, en comparación con los extractos acetónicos y metanólicos (Figura 3b), la cepa más susceptible a dicho extracto fue *S. epidermidis* FES-C con halos de inhibición de  $17.66 \pm 1.52$ mm. Por otra parte, *S. aureus* ATCC 12398 fue la cepa más susceptible al extracto acetónico mostrando halos de  $17.33 \pm 0.57$ mm. El extracto metanólico de tallo únicamente mostró actividad sobre *S. epidermidis* FES-C y *S. aureus* ATCC 12398 con halos de  $7.0 \pm 1.0$  y  $7.66 \pm 0.57$  mm respectivamente.

Los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos mostraron diferencias significativas comparadas con el control positivo (cloranfenicol) ( $p < 0.05$ ), ya que este presentó halos de inhibición entre 22 y 28 mm para las cepas susceptibles a los extractos.



**Figura 3.** Actividad antibacteriana de los extractos de flores (a) y tallos (b) de *D. carthagenensis*. Resultados promedio de tres repeticiones  $\pm$  DE. Los sensibilizadores se impregnaron con 2 mg de extracto. Sa: *S. aureus*; Se: *S. epidermidis*, PaE: *P. aeruginosa*.

**b)Evaluación cuantitativa**

Con la evaluación de las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) se observó que los extractos de flores mostraron mayor actividad antibacteriana al presentar los valores de CMI menores (Cuadros 6 y 7). La cepa *S. aureus* ATCC 29213 fue la más susceptible a los extractos hexánico y acetónico, siendo la CMI 0.125 mg/mL y la CBM 0.250mg/mL en el extracto de flores. Por otra parte, el extracto hexánico de tallo mostró una CMI de 0.5 mg/mL y una CBM de 0.75mg/mL, finalmente con el extracto acetónico se obtuvo una CMI de 0.25 y una CBM de 0.5mg/mL para la cepa mencionada (Cuadro 6).

Con los extractos metanólicos de flores y tallos se obtuvieron los valores de CMI y CBM más elevados para las cepas susceptibles y no mostraron actividad sobre *P. aeruginosa*, *S. aureus* 83 MR y *S. aureus* ATCC 12398 en las concentraciones evaluadas (Cuadros 6 y 7).

**Cuadro 6. CMI y CBM de los extractos de flores de *D. carthagenensis***

Cepa	Extracto					
	Hexánico		Acetónico		Metanólico	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. aureus</i> 83MR	0.25	0.50	0.25	0.50	0.50	1.0
<i>S. aureus</i> ATCC 12398	0.75	>2.0	0.50	0.75	0.75	>2.0
<i>P. aeruginosa</i>	0.75	>2.0	0.25	0.75	NA	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.125	0.25	0.125	0.25	0.50	0.75

Las concentraciones están expresadas en mg/mL; NA=No Activo

**Cuadro 7. CMI y CBM de los extractos de tallos de *D. carthagenensis*.**

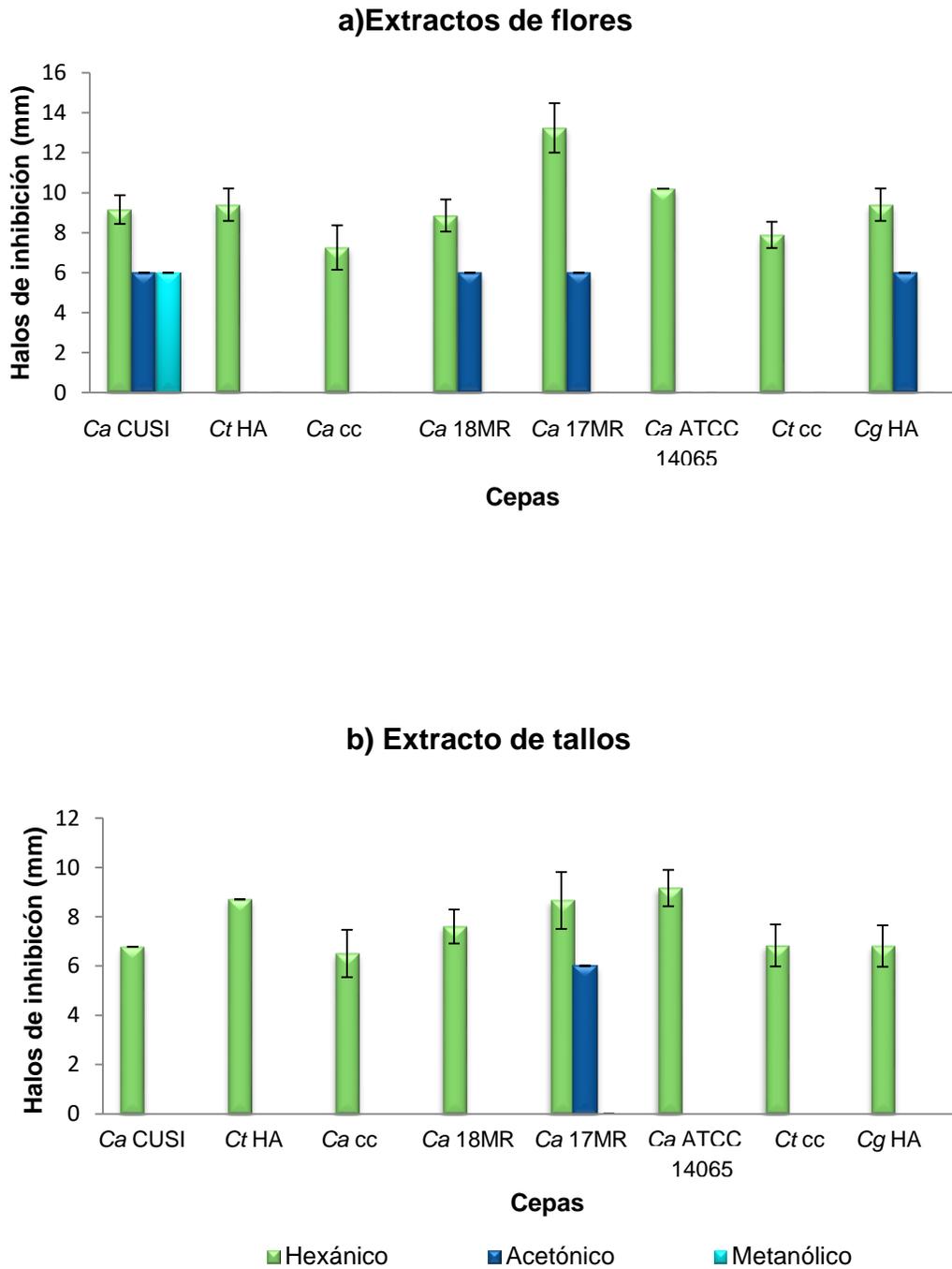
Cepa	Extracto					
	Hexánico		Acetónico		Metanólico	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. aureus</i> 83MR	1.0	1.50	0.75	1.0	NA	NA
<i>S. aureus</i> ATCC 12398	1.0	>2.0	1.0	>2.0	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i>	1.0	>2.0	0.75	2.0	2.0	>2.0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.50	0.75	0.25	0.50	0.75	2.0

Las concentraciones están expresadas en mg/mL; NA=No Activo.

## 4.2 Actividad antifúngica

### a) Evaluación cualitativa

En la evaluación de la actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes los extractos hexánicos fueron los más activos, al inhibir el crecimiento de todas las cepas evaluadas. El extracto hexánico de flores mostró los mayores halos de inhibición (entre  $7.89 \pm 0.66$  y  $13.25 \pm 1.24$ ) (Figura 4a). Los extractos acetónicos y metanólicos no mostraron actividad sobre ninguna de las cepas fúngicas (Figura 4 a y b).



**Figura 4.** Actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes de los extractos de flores (a) y tallos (b) de *D. carthagenensis*. Resultados promedio de tres repeticiones  $\pm$  DE. Los sensibilizadores se impregnaron con 2 mg de extracto. Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*; Ct: *C. tropicalis*.

### Evaluación cuantitativa

En la determinación cuantitativa de la actividad antifúngica sobre levaduras se obtuvo que el extracto hexánico de flores fue el más activo respecto a los extractos acetónico y metanólico, ya que presentó los valores de CMI menores (0.125 mg/mL) (Cuadro 8). Las cepas más susceptibles al extracto hexánico de flores fueron *C. albicans* ATCC 14065, *C. albicans* 17MR, *C. albicans* 18MR, *C. albicans* cc y *C. tropicalis* HA al presentar valores de CMI = 0.125 mg/mL y de CFM 0.25 mg/mL. Por otra parte, el extracto acetónico mostró mayor actividad sobre *C. albicans* 18MR y *C. albicans* 17MR con una CMI de 1.5mg/mL y CFM de 2.0mg/mL. Mientras que el extracto metanólico únicamente tuvo efecto sobre *C. albicans* CUSI con CMI de 2.0mg/mL y CFM mayor a 2.0mg/mL.

**Cuadro 8. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de flores de *D. carthagenensis***

Cepa	Extracto					
	Hexánico		Acetónico		Metanólico	
	CMI	CFM	CMI	CFM	CMI	CFM
<i>C. albicans</i> CUSI	0.25	0.75	0.50	NA	2.0	>2.0
<i>C. tropicalis</i> HA	0.125	0.25	NA	NA	NA	NA
<i>C. albicans</i> cc	0.125	0.25	NA	NA	NA	NA
<i>C. albicans</i> 18MR	0.125	0.25	1.50	2.0	NA	NA
<i>C. albicans</i> 17MR	0.125	0.25	1.50	>2.0	NA	NA
<i>C. albicans</i> ATCC14065	0.125	0.25	NA	NA	NA	NA
<i>C. tropicalis</i> cc	0.25	0.50	NA	NA	NA	NA
<i>C. glabrata</i> HA	0.25	0.50	2.0	>2.0	NA	NA

Las concentraciones están expresadas en mg/mL; NA = No Activo.

En cuanto al extracto hexánico obtenido de los tallos, todas las cepas mostraron una susceptibilidad similar, dado que la CMI y la CFM se alcanzaron en las mismas concentraciones (0.25mg/mL y 0.5mg/ml respectivamente) (Cuadro 9). El extracto acetónico inhibió el crecimiento de las cepas *C. tropicalis* HA con CMI de 1.0mg/mL y CFM 2.0mg/mL y *C. albicans* ATCC 14065 con CMI de 2.0mg/mL. El extracto metanólico no mostró actividad sobre ninguna de las cepas evaluadas.

**Cuadro 9. Actividad antifúngica de extractos obtenidos de tallo.**

Cepa	Extracto			
	Hexánico		Acetónico	
	CMI	CFM	CMI	CFM
<i>C. albicans</i> CUSI	0.25	0.50	NA	NA
<i>C. tropicalis</i> HA	0.25	0.50	1.0	2.0
<i>C. albicans</i> cc	0.25	0.50	NA	NA
<i>C. albicans</i> 18MR	0.25	0.50	NA	NA
<i>C. albicans</i> 17MR	0.25	0.50	NA	NA
<i>C. albicans</i> ATCC14065	0.25	0.50	2.0	>2.0
<i>C. tropicalis</i> cc	0.25	0.50	NA	NA
<i>C. glabrata</i> HA	0.25	0.50	NA	NA

Las concentraciones están expresadas en mg/mL; NA=No Activo, cc=Caso clínico

### 4.3 Actividad antifúngica sobre hongos filamentosos

#### a) Evaluación cualitativa

En la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos todos los extractos, tanto de flores como de tallos, mostraron actividad al inhibir el crecimiento radial de las cuatro cepas de hongos filamentosos evaluados: *A. niger*, *T. mentagrophytes*, *R. lilacina* y *F. sporotrichum*, excepto *A. niger* que no mostró susceptibilidad ante los extractos acetónico y metanólico de tallos (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Actividad antifúngica de los extractos de *D. carthagenensis* sobre hongos filamentosos.**

Cepa	Flores			Tallos		
	Hex	Ace	Met	Hex	Ace	Met
<i>A. niger</i>	●	●	●	●	NA	NA
<i>F. sporotrichum</i>	●	●	●	●	●	●
<i>R. lilacina</i>	●	●	●	●	●	●
<i>T. mentagrophytes</i>	●	●	●	●	●	●

*A. niger*: *Aspergillus niger*, *F. sporotrichum*: *Fusarium sporotrichum*. *R. lilacina*: *Rizoctonia lilacina*, *T. mentagrophytes*: *Trichophytonmentagrophytes*. Hex: hexánico, Ace. acetónico, Met: metanólico, ●: Prueba positiva; NA: no presentó actividad.

### b) Evaluación cuantitativa

En la evaluación cuantitativa el extracto hexánico de flores resultó ser el más activo al inhibir en más de 80% el crecimiento radial de las cuatro cepas de hongos evaluadas con las menores concentraciones (1.0 mg/mL para *A. niger* y *F. sporotrichum*; 0.75 y 0.125 mg/mL para *R. lilacina* y *T. mentagrophytes* respectivamente) (Figura 5a). Además, el extracto mencionado presentó los valores más bajos de CF<sub>50</sub> sobre todas las cepas (0.09 a 0.6 mg/mL) (Cuadro 11).

La cepa más susceptible a todos los extractos fue *T. metagrophytes*, en la cual se observaron porcentajes de inhibición altos en las concentraciones más bajas, su crecimiento radial fue inhibido hasta 90% con los extractos hexánicos y acetónico de flores en las concentraciones de 0.125mg/mL y 0.5mg/mL respectivamente (Figuras 5a, 5b y 6a). El extracto metanólico de flores mostró actividad sobresaliente en las cepas *F. sporotrichum* y *T. mentagrophytes* al inhibir su crecimiento en más del 90% a concentraciones de 1.5 mg/mL (Figura 7a).

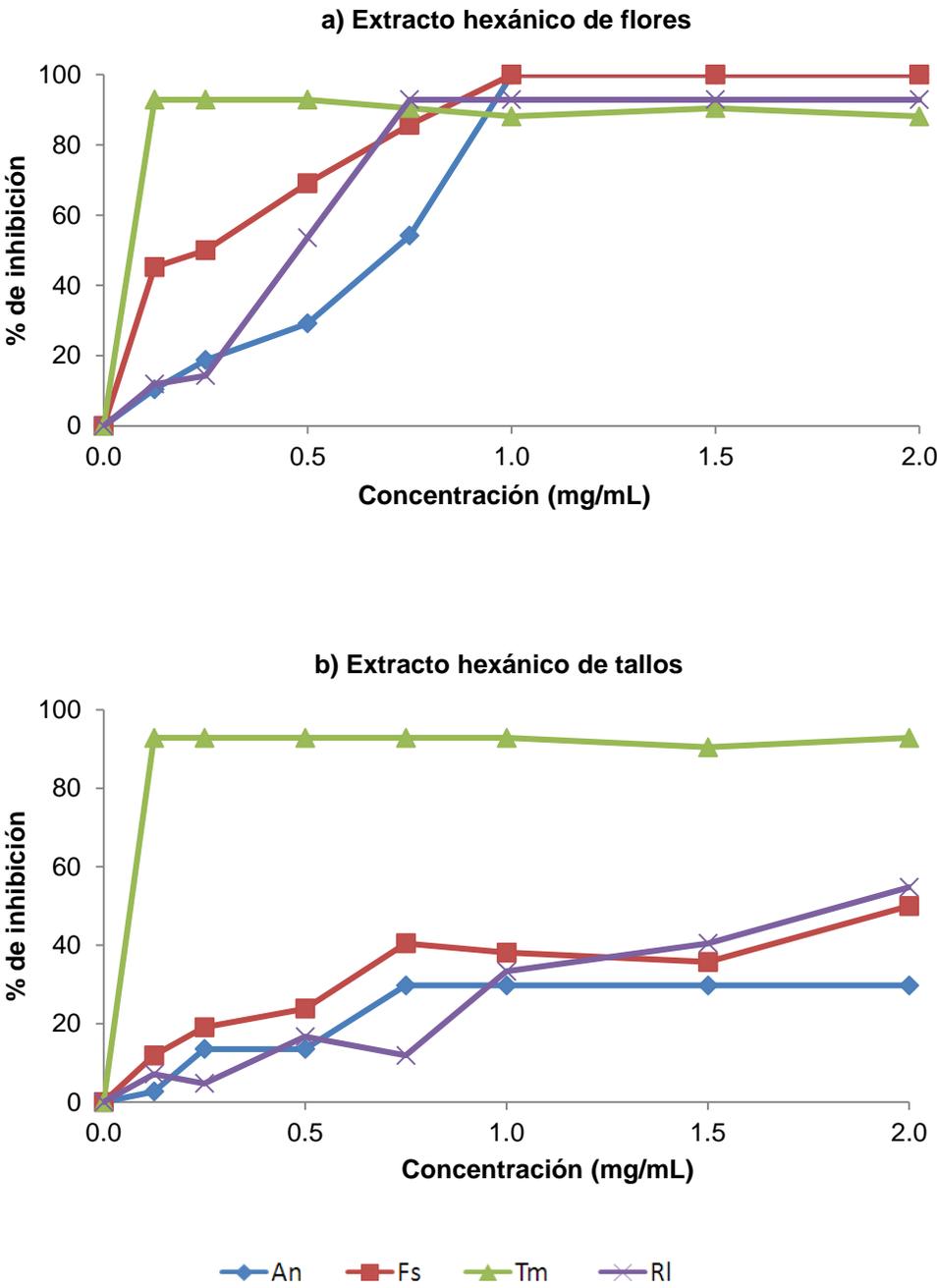
Por otra parte, la especie fúngica menos susceptible fue *A. niger* ya que la mayoría de los extractos activos sobre esta cepa (hexánico de flores y tallos, acetónico y

metanólico de flores) mostraron los menores porcentajes de inhibición (máximo 30% de inhibición del crecimiento radial) (Figuras 5a, 5b, 6a y 7a).

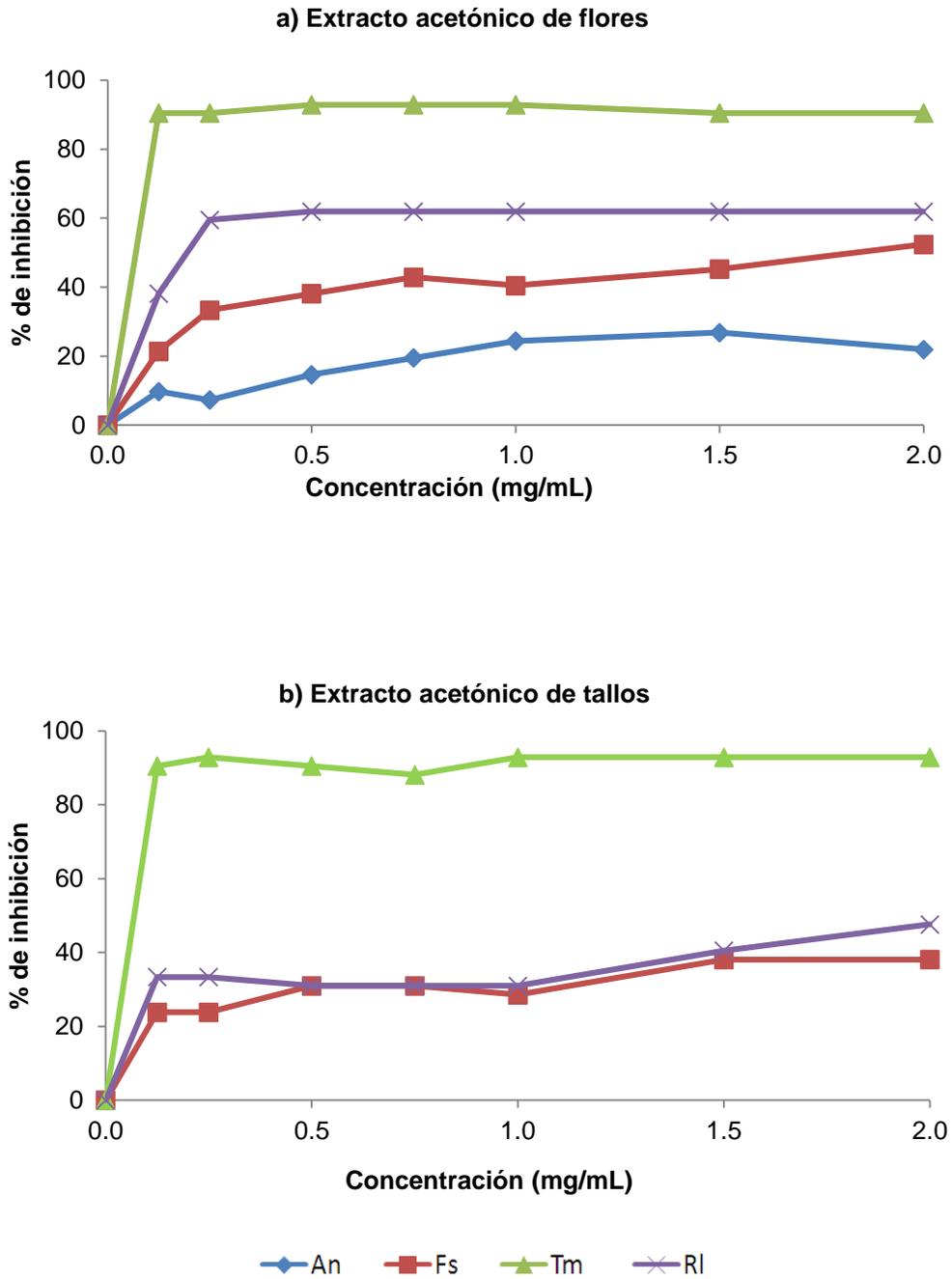
**Cuadro 11. Concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) de los extractos de *D. carthagenensis* sobre hongos filamentosos.**

Cepa	Hexánico		Acetónico		Metanólico	
	Flor	Tallo	Flor	Tallo	Flor	Tallo
<i>A. niger</i>	0.60	1.56*	1.45*	NA	ND	NA
<i>F. sporotrichum</i>	0.33	1.70	0.15*	0.32*	0.50	1.74*
<i>R. lilacina</i>	0.45	1.81	0.20	0.15*	0.17	1.75
<i>T. mentagrophytes</i>	0.09	0.09	0.10	0.10	0.13	1.68

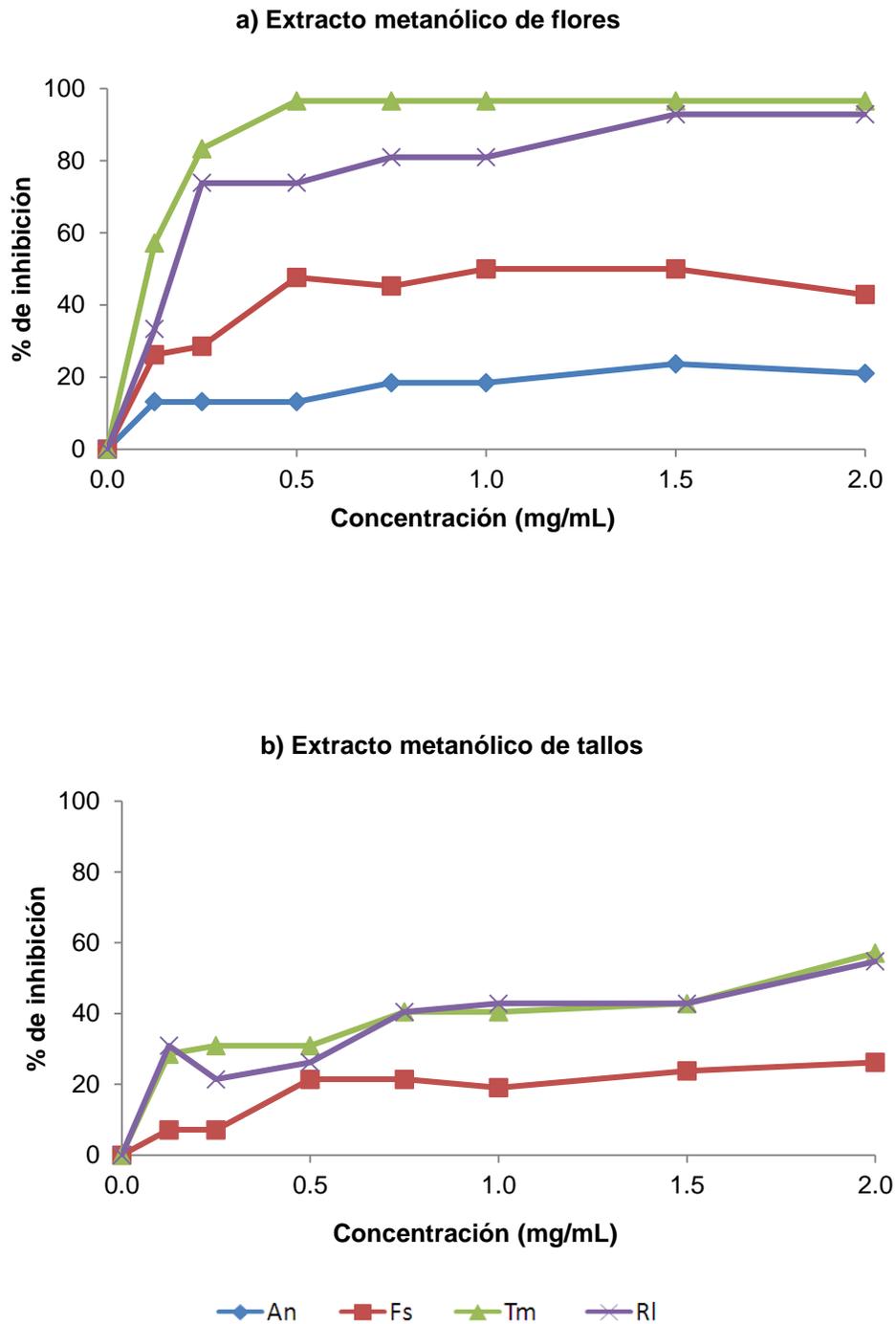
NA: No activo, ND: No determinado. \*CF<sub>25</sub> = Concentración fungicida que inhibe el crecimiento radial en un 25%.



**Figura 5.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto hexánico de flores (a) y de tallos (b) de *D. carthagenensis*. An: *A. niger*, Fs: *F. sporotrichum*, Tm: *T. mentagrophytes*, RI: *R. lilacina*.



**Figura 6.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto acetónico de flores (a) y de tallos (b) de *D. carthagenensis*. An: *A. niger*, Fs: *F. sporotrichum*, Tm: *T. mentagrophytes*, RI: *R. lilacina*.



**Figura 7.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de flores (a) y de tallos (b) de *D. carthagenensis*. An: *A. niger*, Fs: *F. sporotrichum*, Tm: *T. mentagrophytes*, RI: *R. lilacina*.

## DISCUSIÓN

El 80% de la población mundial utiliza las plantas como principal remedio medicinal, esta práctica está asociada generalmente al empirismo (Pauro *et al.*, 2011). Los estudios etnobotánicos realizados en San Rafael Coxcatlán han aportado conocimiento sobre el uso de las plantas de esta región, de las cuales faltan estudios químicos y clínicos que confirmen dichos efectos. La especie *D. carthagenensis* es un ejemplo de ello, ya que no se han realizado estudios que comprueben sus efectos antimicrobianos, analgésicos y antiinflamatorios (BDMTM, 2009). Las evidencias científicas para validar su efectividad radican en evaluar por medio de pruebas cualitativas y cuantitativas la actividad antimicrobiana de esta especie.

En el presente trabajo se obtuvo un mayor rendimiento de los extractos metanólicos (10.72% de flores y 7.44% de tallos), lo que indica que una proporción elevada de los metabolitos secundarios producidos por la planta son de naturaleza polar.

En cuanto a la composición química de los extractos, los resultados de la CG-MS mostraron la presencia de octacosano (23.97%) y heptacosano (40.97%) para los extractos hexánicos de flores y tallos respectivamente. Estos compuestos son hidrocarburos saturados. Resultados similares han sido reportados con anterioridad para la familia Fabaceae. En 2009, Amany y colaboradores reportaron la presencia de 15 ácidos grasos en hojas y 14 en vainas, además señalaron al decacosano como mayor componente de las hojas (17.6%) de *Tipuana tipu*, una especie perteneciente a la familia Fabaceae, por otra parte, Kuate y colaboradores (2005) reportaron la presencia de hidrocarburos en algunas especies de la familia Fabaceae.

Los grupos de metabolitos secundarios identificados por pruebas cualitativas en los extractos fueron predominantemente los fenoles, encontrados en todos los extractos. Dentro de este grupo se identificaron además saponinas y taninos en los extractos acetónico de tallo y metanólico de flor y de tallo. Los terpenos se identificaron únicamente en los extractos hexánicos y los alcaloides en el extracto

hexánico de tallo. Las diferencias en la composición química de los extractos de tallos y flores se deben a que los metabolitos secundarios se distribuyen de manera heterogénea en las distintas partes de las plantas, son producidos y almacenados en células especializadas y distintos compartimentos celulares, incluyendo vacuolas, tricomas y ductos de resina (Huber *et al.*, 2015). Su distribución y acumulación en las estructuras o tejidos de las plantas es influenciada por los factores bióticos y abióticos con los que interactúan (Ganjewala *et al.*, 2009).

La variación en la distribución de los metabolitos secundarios ha sido reportada anteriormente en otras especies del género *Dalea* y de la Familia Fabaceae. Por ejemplo, Castro (2013) reportó la presencia de lactonas en extractos etéreos de flores de *D. mutissi*, dichas pruebas dieron negativo para el extracto de tallos. Por otra parte, en la Familia Fabaceae se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos, glucósidos cianogénicos, terpenoides y alcaloides (Wink, 2013). Además, las especies de esta Familia acumulan alcaloides debido a que pueden fijar nitrógeno atmosférico lo que favorece la producción de metabolitos secundarios nitrogenados.

Por otra parte, en la evaluación de la actividad antibacteriana se observó que los extractos inhibieron el crecimiento de todas las bacterias Gram positivas evaluadas y una Gram negativa (*P. aeruginosa* ATCC 27853). De acuerdo con Ortega y colaboradores (2011) la resistencia a los compuestos antimicrobianos de las bacterias puede estar asociada a sus características estructurales diferenciales, ya que las Gram negativas poseen una doble capa lipídica que les brinda mayor protección en comparación con las Gram positivas que poseen sólo una membrana. Esta actividad antimicrobiana puede atribuirse a la presencia de terpenos en los extractos ya que se ha probado que estos metabolitos son los principales responsables de dicha actividad porque poseen la habilidad para dañar biomembranas, interactuar con las enzimas de la membrana e interferir en procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípido (Belmont, 2009).

Los extractos hexánico, acetónico y metanólico de flores mostraron mayor actividad al presentar los valores de CMI menores, comparados con los extractos de tallos.

Las cepas más susceptibles fueron *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* 83 MR al ser inhibidas por CMI menores (entre 0.125 y 0.25mg/mL para los extractos hexánico y acetónico de flores). Estos resultados coinciden con los datos de Peralta y colaboradores, quienes en 2007 reportaron mayor actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos obtenidos de especies del género *Dalea*. Además, Belofsky en 2004 reportó actividad de especies del género *Dalea* sobre cepas bacterianas Gram positivas, incluyendo a *S.aureus*. Así mismo, Castro en 2013 realizó un estudio antimicrobiano comparativo de hojas y flores de *Dalea mutisii* y reportó actividad antimicrobiana del extracto hexánico. Sin embargo, los datos mostrados con anterioridad, son los primeros reportes para la especie *D. carthagenensis*.

En la evaluación de la actividad antifúngica, los extractos inhibieron el crecimiento de ocho cepas levaduriformes que incluyen a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. El extracto hexánico de flores fue el más activo ya que mostró los mayores halos de inhibición (entre  $7.89 \pm 0.66$  y  $13.25 \pm 1.24$ ) y los valores menores de CMI (0.125 mg/mL). Las cepas más susceptibles al extracto mencionado fueron *C. albicans* ATCC 14065, *C. albicans* 17MR, *C. albicans* 18MR, *C. albicans* cc y *C. tropicalis* HA (CMI = 0.125 mg/mL). Lo anterior coincide con lo reportado para otras especies del género *Dalea*. Peralta *et al.*, en el 2007 evaluaron la actividad antifúngica de *D. boliviana* reportando que *C. albicans* es susceptible al extracto hexánico. Los autores atribuyen este efecto a la presencia de flavonoides tipo flavanona aislados del extracto. Por otra parte, Pérez *et al.*, en el 2003 reportaron efecto antifúngico de *D. elegans* sobre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *Criptomycoccus neoformans*. Además, Peralta *et al.* (2012) reportaron actividad de *D. elegans* sobre *C. albicans*.

En lo referente al efecto antifúngico sobre hongos miceliados, todos los extractos inhibieron el crecimiento radial de las cepas evaluadas, excepto los extractos acetónico y metanólico de tallos, los cuales inhibieron a tres de las cepas fúngicas (*T. mentagrophytes*, *R. lilacina*, *F. sporotrichum*). El extracto hexánico de flores resultó ser el más activo, ya que inhibió en más del 90% el crecimiento radial de las cuatro cepas evaluadas en concentraciones inferiores a 1.0 mg/mL y valores de  $CF_{50}$  de 0.09 a 0.6 mg/mL. La cepa más susceptible fue *T. mentagrophytes*, ya que su crecimiento radial es inhibido hasta 90% con los extractos hexánicos y acetónico de

flores en las concentraciones de 0.125 mg/mL y 0.5 mg/mL respectivamente. De otras especies del género el único trabajo es el de Pérez *et al.*, quienes en 2003 reportaron actividad antifúngica sobre *T. metagrophytes* de un flavonoide aislado de *D. elegans*.

Los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto hexánico de flores sugieren un efecto predominantemente antifúngico, dados los valores de CMI y CF<sub>50</sub> obtenidos, los cuales pueden considerarse bajos debido a que los extractos son mezclas complejas de compuestos, en el extracto mencionado se detectó la presencia de terpenos y del hidrocarburo octacosano. La actividad antimicótica puede atribuirse a los terpenos, ya que Kuate y colaboradores, en el 2005, reportaron en el extracto hexánico de una especie de la Familia Fabaceae hidrocarburos saturados como el octacosano, además de terpenos, los autores mencionan que la actividad antimicótica no está asociada directamente a la presencia de este hidrocarburo, pero sí a la presencia de mono y diterpenos.

Los resultados de este trabajo son relevantes debido a que no existen trabajos previos sobre la actividad antimicrobiana de *D. carthagenensis* de la cual los metabolitos secundarios en los extractos, principalmente en los hexánicos de flores y tallos y el acetónico de flores, poseen propiedad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas, hongos levaduriformes y miceliados. Estos resultados sugieren que los metabolitos secundarios presentes en los extractos mencionados pueden ser los responsables del efecto antimicrobiano, al inhibir microorganismos causantes de infecciones en la piel y en las mucosas, como *S. aureus* y *P. aeruginosa*, los cuales son responsables en gran medida de las infecciones nosocomiales en los hospitales. Además, *S. aureus* es causante de diversas enfermedades como: neumonía, pericarditis, infecciones del tracto urinario y septicemia (Zhong *et al.*, 2015). Por otra parte, las especies de *C. albicans* que resultaron susceptibles a los extractos son responsables de más del 90% de los casos de candidiasis sistémicas y en las mucosas (García-Vidal, 2013). En cuanto a los hongos miceliados, *T. mentagrophytes* es un hongo dermatofito responsable de la mayoría de las infecciones fúngicas superficiales en América (Grannoum *et al.*, 2013; Havlickova *et al.*, 2008). Por lo anterior, los extractos de *D. carthagenensis* representan

recursos potenciales de obtención de fármacos eficaces para inhibir a los microorganismos mencionados.

## CONCLUSIONES

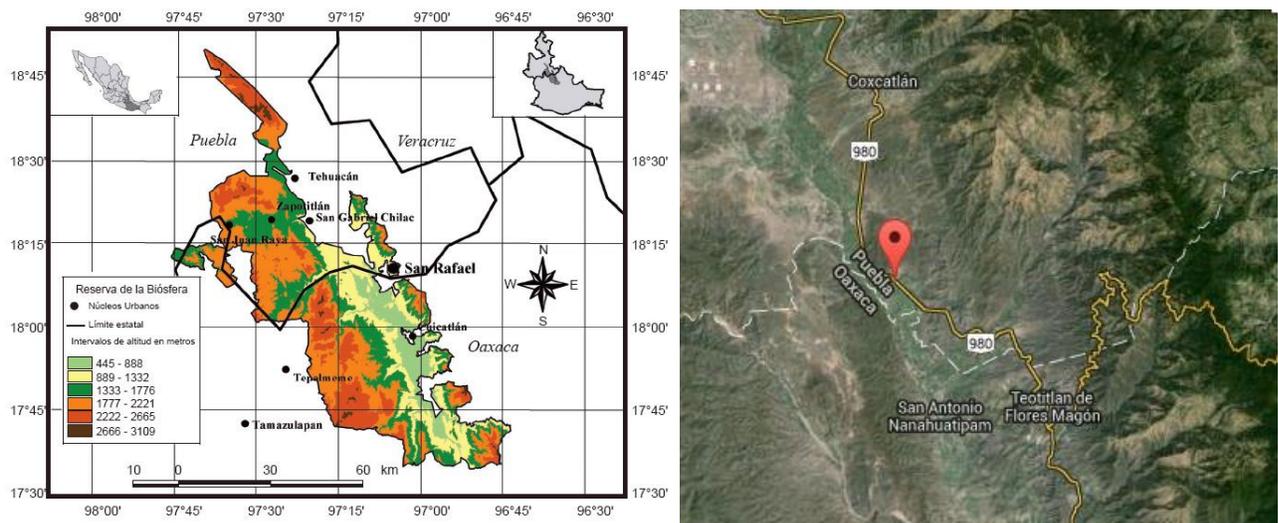
- ✚ *D. carthagenensis* mostró actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas, así como actividad antimicótica sobre levaduras y hongos miceliados.
- ✚ El extracto más activo de *D. carthagenensis* fue el hexánico tanto de flores como de tallos.
- ✚ Los resultados comprueban el efecto antimicrobiano de *D. carthagenensis* y validan su uso en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Área de colecta

La Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán forma parte de la Sierra Madre del Sur y ocupa la zona noroccidental de la subprovincia de la Meseta de Oaxaca, comprende parte del sureste del estado de Puebla. El polígono general comprende el territorio parcial o total de 51 municipios, 20 y 31 correspondientes a los estados de Puebla y Oaxaca, respectivamente con una superficie total de 490 000 hectáreas (CONANP, 2013).

El municipio de Coxcatlán, Puebla se localiza dentro de esta área, así mismo podemos ubicar la comunidad de San Rafael en la porción suroeste del valle de Tehuacán–Cuicatlán a una altitud de 1 217 m. s. n. m. Su clima es semiárido con un promedio anual de temperatura de 22°C. (Figura 8) (Albino *et al.*, 2011). De acuerdo a Rzedowski (2006), la vegetación dominante es el matorral espinoso (Dávila y Lira, 2002).



**Figura 8.** Ubicación San Rafael, Coxcatlán en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán

**Apéndice 2****Método de maceración** (Domínguez, 1973)

El material seco y pulverizado se coloca en un matraz y se agrega el solvente apropiado, de acuerdo al extracto que se desea obtener (hexano, acetona y metanol). Se deja reposar 24 horas para obtener el máximo rendimiento, posteriormente se filtra el extracto y el exceso de solvente se destila a presión reducida. La extracción se realiza cuantas veces sea necesario hasta que el solvente se observe transparente. Finalmente se determina el rendimiento total cuando el solvente se evapora en su totalidad.

**Apéndice 3****Método de difusión en agar de Kirby-Baüer**(Método modificado de Koneman *et al.*, 1991).

La técnica evalúa cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos.

Se utiliza el agar Müeller-Hinton como medio de cultivo estándar, ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas. El espesor del agar deberá alcanzar 4mm uniformemente, si es más fino, las sustancias a evaluar tienden a difundir más en una dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; por el contrario, un agar con espesor mayor a 4mm produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Los inóculos se preparan tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los organismos a ensayar, se sumerge el asa en 10mL de caldo Müeller-Hinton, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de Mc Farland. Esto equivale a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  bacterias por mL

El estándar de 0.5 de Mc Farland se prepara añadiendo 0.5mL de cloruro de bario a 99.5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio puede efectuarse observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o con un espectrofotómetro a 660nm.

Si la suspensión de organismos es menos turbia que el estándar, se vuelve a incubar el tubo, si por el contrario, la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9% hasta igualarlas. Una vez logrado esto se sumerge un segundo hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana y antes de retirarlos 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 de agar Müller-Hinton. Previamente se deja que la placa alcance la temperatura ambiente. Es aconsejable mantener la tapa entre abierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente se siembra mediante estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará la actividad antibacteriana. Para la aplicación de sustancias se utilizan sensidiscos de 5mm de diámetro, hechos de papel Whatman del No. 5. Cada sensidisco se impregna con 2mg de las sustancias a evaluar. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril.

Como control negativo para los bioensayos, se utilizan sensidiscos impregnados con 10µL de los solventes utilizados para la extracción (hexano, acetona y metanol), dejándolos evaporar durante 24 horas, al igual que los experimentales. Como control positivo se evalúa la sensibilidad de las cepas bacterianas a sensidiscos impregnados con 25µg de cloranfenicol.

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad en una incubadora a 37°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 del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente las zonas de inhibición. Así mismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída de pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición.

Para el análisis de los resultados se miden los mm de las zonas de inhibición. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

**Apéndice 4****Método de dilución en agar** (Método modificado de Koneman *et al.*, 1991)

En método se evalúan diferentes concentraciones de los extractos que resultan con actividad antibacteriana, los cuales están representados por 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mg/mL. Para ello se prepara una solución patrón y con base en esta se toman las alícuotas correspondientes, éstas se agregan a 20mL de agar Müeller-Hinton, a una temperatura de 45°C, con la finalidad de obtener las concentraciones señaladas. Una vez agregada cada concentración del extracto, la mezcla se agita rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocan en cajas Petri.

La inoculación se realiza en una suspensión bacteriana con una concentración de  $1.5 \times 10^5$  bacterias por mL. El inóculo se toma con la ayuda de un hisopo estéril, el cual se sumerge en la suspensión bacteriana y se elimina el exceso de líquido antes de retirarlo, haciéndolo rotar contra la pared interna del tubo que contiene dicho inóculo, este se coloca sobre las placas con los extractos con diferentes concentraciones, tocando la superficie del agar por punteo. Este procedimiento se realiza por triplicado.

Como control positivo se utilizan placas sin extracto y como control negativo se usan placas con los diferentes solventes de acuerdo con el volumen de las alícuotas utilizadas.

Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas. La CBM se toma como aquella concentración en la que ya no se observa crecimiento bacteriano y CMI aquella concentración que antecede a la CBM y que aún presenta crecimiento bacteriano, aunque en menor proporción comparado con el grupo control.

**Apéndice 5****Método cualitativo de inhibición de crecimiento radial** (Wang y Bun, 2002).

El ensayo antifúngico cualitativo se realiza en cajas Petri con placas de agar PDA, en el cual se inocula 5mm de micelio del hongo a ensayar los sensidiscos impregnados con 2mg de extracto a una distancia de 2cm del límite micelial. Las cajas se incuban a 28°C durante 72 horas para permitir el desarrollo del micelio. Como control positivo se emplean sensidiscos con 60µg de Ketoconazol. En los casos en que existan zonas de inhibición de los extractos se reportan como positivos, realizándose en todos los casos por triplicado.

**Apéndice 6****Método cuantitativo de inhibición de crecimiento radial** (Wang y Bun, 2002)

Este método se utiliza para determinar la concentración de los extractos que inhiben el crecimiento del micelio, con lo cual se puede determinar la concentración fungicida media ( $CF_{50}$ ) y la concentración fungicida mínima (CFM). Se emplean placas de 24 pozos, las cuales se preparan con diferentes concentraciones de los extractos (0.0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0mg/mL) en agar papa dextrosa (PDA). Posteriormente se inocula en el centro de cada pozo 1mm de diámetro de micelio del hongo a probar. Como testigo se utilizan pozos sin extracto, que son considerados como el 100% de crecimiento radial. Las placas se incuban a 28°C durante 72 horas. La sensibilidad de las cepas experimentales se evalúa al medir el diámetro del micelio. Los datos grafican y mediante un análisis de regresión lineal se determina la  $CF_{50}$  y la CFM. En todos los casos las pruebas se realizan por triplicado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albino G. C., H. Cervantes., M. López, R. L. Casanova y R. Lira. 2011. Patrones de diversidad y aspectos etnobotánicos de las plantas arvenses del Valle de Tehuacán–Cuicatlán: el caso de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82(3).
- Amany L. K., Manal. S. A., Omayma D. E. y Reham O. B. 2009. Chemical Composition, antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil and lipid matter of the flowers and pods of *Tipuana tipu* growing in Egypt. *Canadian Journal of pure and Applied Science*. 3(8).
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M., Sticher, O. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*. 79: 43-52.
- BDMTM (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana). 2009 Disponible en: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro\\_atlas.html](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro_atlas.html). Fecha de consulta: 07 de agosto de 2014.
- Belmont M. R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*. (29).
- Belofsky T. D. Percivill, K. Lewis, G.P. Tegos y J. Ekart. 2004. *Dalea versicolor* phenolic metabolites that enhance antibiotic activity against pathogenic bacteria model. National Library of Medicine, USA. 67(3):4-481.
- Belofsky T., Carreño R., Lewis K., Bola A., Casadei T. y Tegos G. P. 2006<sup>1</sup>. Metabolites of the "Smoke Tree", *Dalea spinosa*, potentiate antibiotic activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products*. 69 (2): 261-264.
- Belofsky G., R. S.M. Carreno, Goswick, y Jhon D.T. 2006<sup>2</sup>. Activity of isoflavans of *Dale aurea* (Fabaceae) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. *Planta Medical*. 72(4).

- Belofsky T. M., Aronica, E. Foss, J. Diamond, F. Santana, J. Darley, P. F. Dowd, C. M. Coleman y D. Ferreira. 2014. Antimicrobial and Antiinsectan Phenolic Metabolites of *Dalea searlsiae*. National Library of Medicine, USA. 77 (5):1140-1149.
- Calvo J. y Martínez. L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. *Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla*. 27(1): 44-52.
- Castro A. G. E. 2013. Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de las Hojas y Flores de Iso (*Dalea mutisii*). Tesis de licenciatura Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad). 2008. La diversidad biológica de México [en línea]. Consultado 26 de agosto de 2014. Disponible: [http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion\\_internacional/doctos/db\\_mexico.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/db_mexico.html).
- CONANP. 2013. Programa de manejo. Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán [en línea]. Consultado 26 de agosto de 2014. Disponible en: [http://www.conanp.gob.mx/que\\_hacemos/pdf/programas\\_manejo/tehuacan\\_2013.pdf](http://www.conanp.gob.mx/que_hacemos/pdf/programas_manejo/tehuacan_2013.pdf)
- Crowley, L. (2014). Una introducción a la enfermedad humana, China: Mc Graw Hill. pp. 107-111.
- Dávila A. P. y Lira, S. 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 [en línea]. Consultado 26 de agosto de 2014. Disponible:[http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora\\_utildos\\_comunidades.html](http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/flora_utildos_comunidades.html)
- Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Ed. Limusa. México. pp 281.

- FTBG (Fairchild Tropical Botanic Garden). 2007. *Dalea carthagenensis*. Disponible en: <http://www.fairchildgarden.org/horticulture/whats-blooming/december-2007>.
- Ganjewala D., S. Sam and K. K. Hayat. 2009. Biochemical compositions and antibacterial activities of *Lantana camara* plants with yellow, lavender, red and white flowers. *EurAsian Journal of BioSciences* 3: 69-77.
- García-Vidal C., D. Viasus and J. Carratala. 2013. Pathogenesis of invasive fungal infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 26:270-276.
- Ghannoum M. A., Long L., Cirino A. J., Miller A. R., Najafi R., Wang L., Sharma K., Anderson M., and Memarzadeth B. 2013. Efficacy of NVC-422 in the treatment of dermatophytosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* using a guinea pig model. *International Journal of Dermatology*. 52: 567-571.
- Havlickova B., Czaika V. A., and Friedrich M. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51: 2-15.
- Huber M., Triebwasser-Freese D., Reichelt M., Heiling S., Paetz C., Chandran J. N., Bartram S., Schneider B., Gershenzon J. 2015. Identification, quantification, spatiotemporal distribution and genetic variation of major latex secondary metabolites in the common dandelion (*Taraxacum officinale* agg.). *Phytochemistry* 115: 89-98.
- Kuiate JR, Bessière JM, Zollo PH, Kuate SP. 2005. Chemical composition and antidermatophytic properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitanica* from Cameroon. *Journal Ethnopharmacol.* 2, 160.
- Koneman, E. W., Allen, S. D. Dowell, V. R., Sommers, H. M. 1991. *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. México. pp. 386-393.

- Loraine S. J. y Mendoza A. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41(4):18-27.
- Martínez M.M., Ocampo D. M., Galvis J. H. y Valencia A. 2011. Actividad antibacteriana y citotóxica *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16(4).
- Merck Sharp & Dohme. 2013. Biología de las enfermedades infecciosas [en línea]. Consultado 19 de agosto de 2014. Disponible: <http://www.msdsalud.es/manual-merck-hogar/seccion-1/biologia-enfermedades-infecciosas.html>
- Nanayakkara N. P., Burandt C. L. y Jacob M. R. 2002. Flavonoids with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of *Dalea scandens* var. paucifolia. *Plantas Medicinales*. 68 (6): 22-519.
- Olalde P. V. y Aguilera G. L. I. 1998. Microorganismos y biodiversidad. *Revista Terra Latinoamericana*. 16 (3): 289-292.
- Ortega S.M., Campo B. M. y Fajardo C. F. A. 2011. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Cauca. *Artículos de Investigación Científica y Tecnológica*. 9(1): 8-16.
- Pauro R. J., F. Gonzáles, B.M. Gamarra, J.R. Pauro, F. Mamani y R. B. Huerta. 2011. Plantas alimenticias, medicinales y biocidas de las comunidades de Manani y Suatia provincia de Lampa (Puna-Parú). *Revista Ecología aplicada*. 10(1):41-49.
- Peralta A. M., Pérez C., Ortega G. M., Agnese A. M., Cabrera J. L. y Paz C. 2007. Estudios químicos y farmacológicos destinados a la nueva búsqueda de nuevos antimicrobianos de origen vegetal. CONICET.
- Peralta M. A., Cabrera J. L. y Pérez C. 2013. Potencialidad terapéutica, de los flavonoides, prenilados, Flavonoides prenilados, como potenciales componentes de medicamentos. *Revista Facultad de Odontología UBA*. 28(64).

- Peralta MA, Calise M, Fornari MC, Ortega MG, Diez RA, Cabrera JL y Pérez C. 2012. A prenylated flavanone from *Dalea elegans* inhibits rhodamine 6 G efflux and reverses fluconazole-resistance in *Candida albicans*. *Planta Medical*. 78(10):7-918.
- Pérez C., Ortega G. M., Agnese A. M., y Cabrera L. J. 2003. Estudios Complementarios antimicrobianos de 2'4'-dihidroxy-5'-(1-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin de *Dalea elegans*. *Revista Biología Farmacéutica*. 41(3):171-174.
- Rzedowski, J., 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 504 pp.
- Tortora G. J., R. Berdell, C. Funke y L. Case. 2007. *Introducción a la Microbiología*. Ed Panamericana. 959pp.
- UNIBIO: Colecciones Biológicas. "*Dalea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr." 2010-05-27. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. URL: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn31349>. Fecha de consulta: 2015-5-29.
- Villaseñor J. L. y E. Ortíz. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85:134-142.
- Wink, 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 89:164-175.
- Wang, H., Bun, B. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61:1-6.
- Zambrana A. T. 2005. Beneficios de la fitoterapia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 10(2).
- Zhong D., Y. Zhuo, Y. Feng and X. Yang. 2015. Employing carbon dots modified with vancomycin for assaying Gram-positive bacteria like *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics* 74: 546-553.