



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE *Lippia*
oaxacana Rob et. Greenm”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

VIRIDIANA REMEDIOS ESCARTÍN ALPIZAR

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. JULIETA OROZCO MARTÍNEZ



TLALNEPANTLA, EDO. MÉX. NOVIEMBRE, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 DGAPA UNAM.

*“Thinking of you, wherever you are.
We pray for our sorrows to end,
and hope that our hearts will blend.
Now I will step forward to realize this wish.
And who knows,
starting a new journey may not be so hard
or maybe it has already begun.
There are many worlds,
but they share the same sky---

One sky, one destiny.”*

Kairi

Kingdom Hearts 

Agradecimientos

Muchas personas hicieron posible la realización de este trabajo y también ayudaron muchísimo en el término de la última etapa de mi carrera *a tiempo*. Su paciencia, su tiempo, su alegría, su sabiduría, su entusiasmo, su confianza, sus consejos y todo lo demás que no viene a mí en este momento, se los agradezco mucho.

Sin todo lo anterior esto no existiría o simplemente estaría inconcluso. A todas esas personas (que saben perfectamente quienes son) a cada una de ellas, les estaré siempre agradecida.

Y por más cursi, absurdo, tonto o lo que mejor les parezca, agradezco a la carrera de Biología por hacer de esta época de mi vida, la vida universitaria, sin temor a exagerar, la mejor época de toda mi vida. Desde el primer día de clases, que curiosamente llegué tarde, hasta el día de mi titulación he disfrutado, sufrido, maldecido, odiado y amado con tantas fuerzas a la Biología.

Para mi yo pasado, que pasaste un momento que nos cambió.

Este trabajo es una pequeña muestra de las cosas que puedes hacer, aún en momentos de tristeza, angustia o depresión.

Cada vez que pases por situaciones donde te invadan sentimientos similares a los de antes quiero que tomes esto y veas de lo que eres capaz. A pesar de tener a pocos o muchos en tu contra o contigo, debes continuar, debes vivir a tu manera, a tu ritmo y ser solamente tú quien tome las decisiones de tu vida. Porque siento que eso es vivir. Creo que esa es la manera en la que debemos de vivir.

«Plus tard il sera trop tard.

Notre vie c'est maintenant.»

Jacques Prevert

출다 씨, 사랑해요.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
▪ Valle de Tehuacán-Cuicatlán.....	3
▪ Género <i>Lippia</i>	6
Hipótesis.....	8
Justificación.....	8
Objetivos.....	8
▪ Objetivo General.....	8
▪ Objetivos Particulares.....	8
Metodología.....	9
▪ Colecta de planta.....	9
▪ Obtención de los extractos.....	9
▪ Actividad antibacteriana.....	9
▪ Evaluación Cualitativa de la Actividad Antibacteriana.....	9
▪ Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antibacteriana.....	10
▪ Curvas de Crecimiento Bacteriano.....	10
▪ Actividad Antifúngica.....	10
▪ Evaluación Cualitativa de la Actividad Antifúngica.....	10
▪ Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antifúngica.....	11
▪ Caracterización Fitoquímica de los Extractos Activos.....	11
▪ Contenido de Fenoles Totales (CFT).....	12
▪ Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	12
▪ Toxicidad General.....	12
▪ Análisis Estadísticos.....	12
Resultados y Análisis.....	13
▪ Colecta de la planta y Obtención de extractos.....	13
▪ Evaluación Actividad Antibacteriana.....	13
▪ Curvas de Crecimiento Bacteriano.....	15

▪ Evaluación de la Actividad Antifúngica.....	16
▪ Caracterización Fitoquímica.....	17
▪ Contenido de Fenoles Totales (CFT).....	20
▪ Actividad Antioxidante.....	21
▪ Toxicidad General.....	22
Discusión.....	23
Conclusiones.....	31
Apéndices.....	32
▪ Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.....	32
▪ Método de dilución en agar.....	34
▪ Efecto de los extractos sobre el crecimiento bacteriano.....	35
▪ Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar.....	36
▪ Determinación de la concentración fungicida media (CF ₅₀).....	37
▪ Contenido de Fenoles Totales (CFT).....	38
▪ Reducción del radical 2,2-diphenil-1-Picrilhidracilo (DPPH).....	40
▪ Caracterización Fitoquímica de los Extractos.....	42
▪ Toxicidad General.....	43
Literatura Consultada.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatán.....	4
Figura 2. <i>Lippia oaxacana</i> Rob et Greenm.....	8
Figura 3. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	15
Figura 4. Comportamiento del extracto metanólico de <i>L. oaxacana</i> sobre la cepa <i>S. aureus</i>	17
Figura 5. Comportamiento del extracto metanólico de <i>L. oaxacana</i> sobre la cepa <i>K. pneumoniae</i>	18
Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>F. sporotrichum</i> con las distintas concentraciones del extracto metanólico.....	19
Figura 7. Cromatograma del extracto metanólico de <i>L. oaxacana</i> obtenido en HPLC	21
Figura 8. Actividad antioxidante del control positivo (Quercetina), sobre el radical DPPH.....	23
Figura 9. Actividad antioxidante del extracto metanólico de <i>L. oaxacana</i> , sobre el radical DPPH.....	23
Figura 10. Evaluación de la toxicidad general del extracto metanólico de <i>L. oaxacana</i> en larvas nauplio II de <i>A. salina</i>	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos etnobotánicos de <i>L. oaxacana</i>	14
Tabla 2. Rendimientos de los extractos obtenidos de <i>L. oaxacana</i>	14
Tabla 3. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>L. oaxacana</i>	16
Tabla 4. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos metanólico y hexánico de <i>L. oaxacana</i>	20
Tabla 5. Cromatografía de HPLC del extracto metanólico de <i>L. oaxacana</i>	21
Tabla 6. Compuestos identificados en el extracto hexánico de <i>L. oaxacana</i> a través de CG-EM.....	22
Tabla 7. Escala de toxicidad en larvas nauplio de <i>A. salina</i>	24
Tabla 8. Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.....	43
Tabla 9. Pruebas cualitativas de los principales grupos de metabolitos secundarios con su respectivo reactivo y apariencia positiva.....	44

Resumen

L. oaxacana es utilizada en la medicina tradicional en forma de agua de baño en mujeres después del parto, para sanar más rápido. También es usada vía oral para tratar malestares gastrointestinales; sin embargo no se cuenta con suficientes estudios que validen su uso. El objetivo de este fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos hexánico y metanólico de *L. oaxacana* obtenidos por maceración. La evaluación se realizó en 20 cepas bacterianas, tres cepas levaduriformes y cuatro hongos miceliados. Utilizando la técnica de Kirby-Baüer e inhibición de crecimiento radial. Los extractos fueron activos sobre cepas Gram positivas (*S. aureus* cc, *S. aureus* CUSI, *S. aureus* FES-C) y cepas Gram negativas (*S. enterica* ATCC 7251, *K. pneumoniae* y *V. cholerae* ATCC 39540). Las cepas más susceptibles a los extractos hexánico y metanólico fueron *S. aureus* y *K. pneumoniae* (CMI= 1.5 y 1.0 mg/mL respectivamente). Los extractos no mostraron actividad antifúngica para cepas levaduriformes. El extracto metanólico mostró actividad sobre *F. sporotrichum*. En la caracterización fitoquímica del extracto hexánico se identificaron glicósidos, flavonoides y terpenos, mientras que en el metanólico se identificaron fenoles, taninos y flavonoides; con base en las cromatografías realizadas para cada tipo de extracto (HPLC para el metanólico y CG-EM para el hexánico) se determinó que en el extracto metanólico hay 12 compuestos, identificados con una longitud de onda de 280 nm, de los cuales el 78.5% son fenilpropanoides (siete tipos) y el 21.5% son flavonoides (cinco tipos); mientras que la CG-EM mostró que el extracto hexánico posee ocho compuestos, de los cuales uno ha sido reportado con propiedades antimicrobianas (eugenol). El extracto metanólico posee mayor actividad antioxidante (4.17 µg/mL) comparada con la del control positivo (quercetina: 6.05 µg/mL). El extracto metanólico resultó ser muy tóxico en concentraciones mayores a 100 µg/mL en *Artemia salina*. Los extractos hexánico y metanólico de *L. oaxacana* poseen actividad antimicrobiana y el extracto metanólico posee actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

El ser humano a través del tiempo ha encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas empleando las plantas a nivel industrial, alimenticio y medicinal (en forma de infusiones, tés o jugos), convirtiéndose en materias primas de vital importancia para el avance de la humanidad (Butler, 2005).

El uso de las plantas medicinales es una práctica tan antigua como el ser humano. Éstas se han sometido a diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos para verificar su efectividad, demostrando tener propiedades terapéuticas gracias a compuestos químicos llamados metabolitos secundarios (Pino y Valois, 2004; Cowan, 1999).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que además de participar en la adaptación de las plantas a su ambiente (Sepúlveda-Jiménez, 2004), también actúan contra microorganismos, herbívoros o poseen actividad antioxidante, antimicrobiana, entre otras (Croteau *et al.*, 2000).

El conocimiento de las propiedades químicas de los extractos obtenidos de las plantas permite proponerlas como fuente alternativa y natural de compuestos útiles en la farmacología (Stashenko *et al.*, 2003). La medicina convencional se ha visto comprometida en su éxito con la cura de algunas enfermedades por los efectos colaterales que algunos medicamentos acarrearán, o bien, por el aumento en la resistencia de los microorganismos, ya sea por la comercialización de medicamentos de baja calidad o por su uso indiscriminado. Por esto, el interés en la herbolaria ha ido aumentando (OMS, 2002).

Los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, siendo la base de las primeras medicinas y permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los antibacterianos y antifúngicos. En los últimos años más de la mitad de los productos

farmacéuticos usados son derivados de fuentes naturales (Newman y Cragg, 2007; OMS, 2001).

México tiene un gran potencial para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos debido a su gran diversidad biológica. Ocupa el 1.5% de la superficie terrestre global y es reconocido como país megadiverso, ya que se estima que entre el 10 y 12% de las especies de plantas del planeta están presentes en nuestro país, sumándole a este que del 40 al 60% son especies endémicas (Sansón, 2012). En México se han reconocido 24,042 especies de plantas vasculares (Villaseñor, 2004), de las cuales la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI) registró alrededor de 3,000 con aplicaciones medicinales (Sarukhán *et al.*, 2009), lo que equivale aproximadamente a 12.5% del total de la riqueza florística del país; no obstante sólo el 1% se ha estudiado de forma detallada (Aguilar *et al.*, 1994).

Dentro del país, se han establecido zonas donde se albergan una cantidad alta de especies con importancia tradicional, comestible e incluso médica, por mencionar algunas. Uno de estos lugares es el Valle de Tehuacán Cuicatlán (Dávila *et al.*, 2002).

Valle de Tehuacán-Cuicatlán

El Valle fue declarado como Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán (RBTC) en 1998, comprende un área relativamente pequeña (10,000 km²) localizada en el extremo sureste del estado de Puebla y en la parte adyacente del estado de Oaxaca (Figura 1). Al poseer una biodiversidad excepcional se ha convertido en la zona árida y semiárida de Norteamérica con mayor riqueza biológica (Dávila *et al.*, 2002).

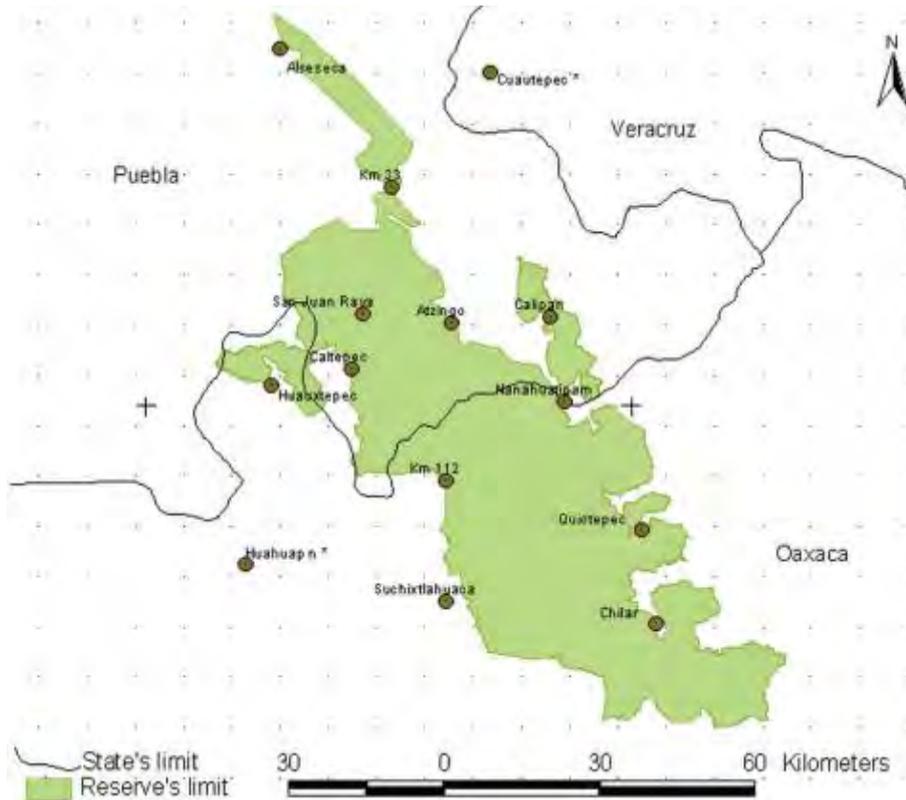


Figura 1. Ubicación geográfica de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Tomado de Ortiz-Pulido *et al.*, 2012.

La cantidad de especies registradas en el Valle es similar a la registrada en el Desierto Sonorense, y alrededor de 1,000 especies menores que en el Desierto Chihuahuense. Sin embargo, si se compara la extensión de estas regiones (275,000 km² del Desierto Sonorense y 453,000 km² del Desierto Chihuahuense) con la extensión relativamente pequeña de la RBTC, se verá que esta última parece ser la zona árida con mayor diversidad florística de México, sin olvidar el alto índice de endemismos (Valiente-Banuet *et al.*, 2009; Dávila *et al.*, 2002). La RBTC tiene entre el 10-11.4% de las aproximadamente 30,000 especies de plantas vasculares encontradas en México. La flora vascular que alberga la RBTC contiene 180 familias, 891 géneros y 2621 especies. El nivel de especies registrado de endemismos en la RBTC es alrededor de 356 especies, o sea un aproximado de 13.9% de la flora vascular conocida del valle es endémica (Dávila *et al.*, 2002).

El clima está determinado por los vientos predominantes del este con lluvias durante el verano y por vientos del oeste en invierno. La aridez de la región se

debe en gran parte al efecto de sombra orográfica provocada por la Sierra Madre Oriental conocida en esa zona como Sierra Zongolica. Se han reportado climas como cálidos, semicálidos y templados con precipitaciones medias anuales de 700-800 mm, 400-500 mm y 600 mm respectivamente. También presenta una variada composición de rocas en su superficie, incluyendo rocas sedimentarias (calizas, areniscas, lutitas) y en menor proporción rocas volcánicas y metamórficas, posee también diversas formas de relieve y suelos. Estos factores en conjunto influyen para conformar un mosaico de variantes de vegetación distribuido en el espacio (Valiente-Banuet *et al.*, 2009).

El territorio que conforma la RBTC juega un importante papel en el mantenimiento de los servicios ambientales de la región, ya que contribuye a la captación de agua y recarga de mantos acuíferos, la captación de carbono, la conservación de los suelos y de la biodiversidad (SEMARNAT y CONANP, 2013).

Dentro de cuevas en el Valle se ha encontrado evidencia, hasta ahora la más antigua, de prácticas agrícolas y domesticación de plantas del Continente Americano, entre ellos el maíz, frijol y calabaza, haciendo que esta zona sea declarada como la cuna de la domesticación del maíz. Hay evidencia de que se crearon sistemas de manejo hidráulico como la presa de Purrón, de las más antiguas de Mesoamérica, lo que permitió la intensificación de la agricultura (Valiente-Banuet *et al.*, 2009).

En la actualidad, el Valle mantiene distribuidas cientos de comunidades indígenas y su cultura ha sido motivo de atención de antropólogos y etnobiólogos pues son una fuente crucial de información para la documentación de procesos de uso y manejo de los recursos locales (Valiente-Banuet *et al.*, 2009).

En el Valle existe una gran tradición sobre el uso de plantas medicinales identificándose a más de 90 especies utilizadas en la medicina tradicional, muchas son empleadas de diversas maneras por los mismos habitantes para tratar padecimientos como erupciones, picaduras o inflamaciones, incluso han sido usadas como remedio para tratar enfermedades respiratorias o gastrointestinales. A pesar de esto muchas de ellas no cuentan con estudios

científicos acerca de sus propiedades medicinales y su composición química (Hernández *et al.*, 2015). La información disponible sugiere que la riqueza de recursos vegetales aprovechados por los humanos es muy elevada (Hernández *et al.*, 2005).

En la RBTC se han identificado hasta 815 especies de plantas vasculares que son utilizadas por los habitantes de la zona y de las cuales un aproximado de 159 especies son empleadas como remedios para la curación de diferentes afecciones. La Familia Verbenaceae tiene gran importancia en la RBTC, tanto por el número de especies presentes como por el uso que se les da (Hernández *et al.*, 2005).

Dentro de las plantas con características medicinales del país y que se encuentran en el Valle Tehuacán-Cuicatlán son las pertenecientes a la familia Verbenaceae, entre ellas las del género *Lippia*. Este se caracteriza por reunir especies a las que se les atribuyen cualidades aromáticas. Algunas plantas de éste género han sido ampliamente estudiadas en relación con la composición química de sus aceites esenciales (e.g: *L. alba*, *L. multiflora*) demostrando que poseen actividad antimicrobiana (Stashenko *et al.*, 2014).

Algunos estudios que se han realizado con especies del género *Lippia*, son el de Viljoen y colaboradores que en el 2004 evaluaron el aceite esencial de *L. javanica* sobre *Cryptococcus neoformans*, *Bacillus cereus* y *Klebsiella pneumoniae*, observando un efecto bacteriostático en esta última cepa. Filho y colaboradores en el 2006, obtuvieron en los extractos metanólico y etanólico de *L. alba* actividad antimicrobiana y se detectó la presencia de terpenoides, fenilpropanoides y azúcares. En otro estudio realizado por Vera y colaboradores en el 2007, reportan que los extractos volátiles de *L. alba* mostraron actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, Henao y colaboradores en el 2009, trabajaron extractos de *L. origanoides*, el extracto hexánico y diclorometano, en ellos encontraron esteroides, glicósidos cardiotónicos y carotenoides, mientras que en extracto etanólico encontraron flavonoides, taninos, hidroquinonas, alcaloides y glicósidos cardiotónicos. Hernández y colaboradores en el 2015, realizaron un estudio con diversas especies de plantas medicinales (entre ellas *L.*

graveolens), resultando que su aceite esencial presentó actividad antibacteriana en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Dentro de este trabajo reportan que el extracto metanólico de *L. graveolens* posee actividad antioxidante y también posee un alto contenido de compuestos fenólicos. Otros trabajos han reportado que especies de este género poseen actividad antioxidante, como en el trabajo realizado por Toscano en el 2015, en el cual reporta que el extracto metanólico de *L. graveolens* posee actividad antioxidante. Stashenko y colaboradores en el 2014, utilizando aceites esenciales de diversas especies de *Lippia* (e. g. *L. citriodora*, *L. graveolens*, *L. micromera*, etcétera) concluyen que los aceites de todas las especies evaluadas poseen actividad antioxidante, incluso mejor que la de productos comerciales como butilhidroxitolueno (BHT) o α -tocoferol.

Es importante saber que los antioxidantes son compuestos que pueden limitar o inhibir la oxidación de biomoléculas, pues limitan la propagación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO están relacionadas con la incidencia de varias patologías humanas, entre ellas el cáncer, cardiopatías, problemas neurodegenerativos como Alzheimer, Parkinson, etc; además de procesos de envejecimiento, inflamación y cicatrización (Aiyegoro y Okoh, 2009).

A pesar de esto aún hay especies dentro de este género que no han sido estudiadas por sus propiedades medicinales, este es el caso de *Lippia oaxacana*, comúnmente conocida como “Salve Real”, es una planta herbácea de 50 cm de alto aproximadamente, con aroma fuerte y con flor blanca (Figura 2).

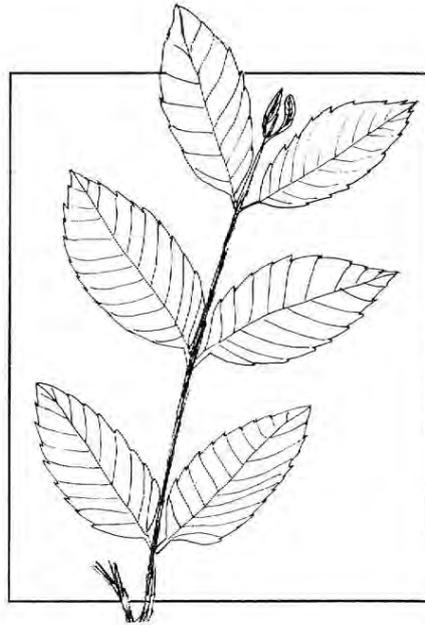


Figura 2. *Lippia oxacana* Rob et. Greenm. Imagen tomada de la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>

En Popoloca de San Marcos Tlacoyalco y San Juan Atzingo, Puebla, usan esta planta como agua de baño para después del parto, así las mujeres se desinflan y sanan más rápido (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Instituto de Biología, 2011), también en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, se ha reportado el uso de esta especie vía oral en forma de té para tratar malestares gastrointestinales (Hernández *et al.*, 2003).

Hernández y colaboradores en el 2003 realizaron un ensayo preliminar sobre la actividad antibacteriana del extracto hexánico de *L. oxacana*, encontrando actividad sobre cepas Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, aún faltan estudios que validen el uso medicinal de *L. oxacana*, y así contribuir con el conocimiento de especies medicinales en México.

HIPÓTESIS

Las plantas sintetizan diversos metabolitos secundarios, algunos de estos presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, etcétera. La especie *L. oxacana* es utilizada en algunas localidades del Valle de Tehuacán-Cuicatlán para contrarrestar enfermedades de posible origen infeccioso y también como desinflamatorio después del parto. Además, se ha reportado que dicha especie presenta actividad antibacteriana y especies de la

misma familia han sido reportadas con actividad antioxidante. Por esto es probable que los extractos de *L. oaxacana* presenten dichas bioactividades.

JUSTIFICACIÓN

L. oaxacana es utilizada en la medicina tradicional por varias comunidades de Puebla y Oaxaca dentro de la RBTC para tratar malestares de posible origen infeccioso, por lo que es importante validar su uso y contribuir al conocimiento de la especie.

OBJETIVOS

Objetivo general

-Evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos de *L. oaxacana*.

Objetivos particulares

-Obtener los extractos herbales de distinta polaridad (hexánico y metanólico) de *L. oaxacana* y determinar sus rendimientos.

-Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *L. oaxacana*.

-Evaluar el efecto de los extractos activos mediante la curva de crecimiento de poblaciones bacterianas.

-Determinar cualitativamente la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos de *L. oaxacana*.

-Determinar el Contenido de Fenoles Totales (CFT) y la actividad antioxidante del extracto metanólico de *L. oaxacana*.

-Determinar la Toxicidad General del extracto metanólico de *L. oaxacana* sobre *Artemia salina*.

METODOLOGÍA

COLECTA DE LA PLANTA

L. oaxacana se colectó en la localidad de Acatepec, Puebla. En la carretera rumbo a Caltepec en las coordenadas 18°12'22.22"N y 97°34'16.8" W, y a una altitud de 1574 msnm. Se llevó un ejemplar al Herbario IZTA para su identificación (número de colecta: HCM137).

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los extractos de *L. oaxacana* se obtuvieron de las partes aéreas (tallos y hojas) por el método de maceración utilizando solventes de diferente polaridad (metanol y hexano). Una vez obtenidos los extractos se procedió a filtrarlos, posteriormente se destiló el exceso de solvente a presión reducida en un rotavapor. Los extractos se colocaron en recipientes de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente y se procedió a determinar el rendimiento total (Domínguez, 1979).

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Microorganismos utilizados para los bioensayos:

Cepas Bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* cc, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 23MR, *S. aureus* FES-C, *S. aureus* CUSI, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* FES-C, *Micrococcus luteus* ATCC 10240a, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506.

Cepas Bacterianas Gram negativas: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi ATCC 7251, *S. typhi*, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter gergoviae* ATCC 33028, *E. aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* 82MR, *E. coli* CUSI, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Vibrio cholerae* ATCC 39540, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Evaluación Cualitativa de la Actividad Antibacteriana

Para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana se empleó el método de Kirby-Baüer (Apéndice I). En cada sensidisco se colocaron 2 mg de los extractos a evaluar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo sensidiscos con 10 µL de cada uno de los solventes empleados. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Koneman *et al.*, 1996).

Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antibacteriana

Los extractos y cepas que presentaron un resultado positivo en la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, se emplearon para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por medio de la técnica de dilución en agar (Apéndice II), utilizando concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL y un grupo testigo, cada una con tres repeticiones (Koneman *et al.*, 1996).

Curvas de sobrevivencia

Se realizaron con las cepas bacterianas más sensibles en la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana (una Gram positiva y una Gram negativa), posteriormente se llevó a cabo el monitoreo del crecimiento de las poblaciones de cepas bacterianas en 9 tiempos durante 24 horas (Apéndice III), mismas que se expusieron a diferentes concentraciones de los extractos activos ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Kubo *et al.*, 1993, citado en Avila, 1996).

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Microorganismos empleados:

Hongos filamentosos: *Tricophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum*, *F. moniliforme*, *Aspergillus niger*.

Hongos levaduriformes: *Candida albicans* 17MR, *C. glabrata* cc, *C. tropicalis* cc.

Evaluación Cualitativa de la Actividad Antifúngica

Para cepas de hongos filamentosas se empleó el método de inhibición de crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se impregnaron sensidiscos con 2 mg del extracto, como control negativo se utilizaron sensidiscos con 10 μ L de cada uno de los solventes empleados y como control positivo sensidiscos con 56 μ g de Ketoconazol. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice IV). La evaluación para las cepas levaduriformes se llevó a cabo con el método de difusión de Kirby-Baüer mencionado anteriormente, utilizando como control positivo 30 μ g de nistatina y como control negativo 10 μ L de cada uno de los solventes empleados.

Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antifúngica

Para la determinación de la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se utilizó el método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) en cepas de hongos filamentosos (Apéndice V). Como medio de cultivo se empleó agar de papa dextrosa (PDA). Las concentraciones para cada bioensayo fueron 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ACTIVOS

Los extractos se analizaron mediante las pruebas cualitativas descritas por Domínguez en 1979 (Apéndice VIII), de presencia y/o ausencia de alcaloides (Mayer), fenoles (Cloruro férrico), taninos (FeCl₃), glicósidos (Molish), terpenos (vainillina y ácido sulfúrico), cumarinas (NaOH), saponinas (prueba de espuma), esteroides y triterpenos (Reactivo de Lieberman-Buchard).

Adicionalmente se realizaron pruebas cromatográficas para cada tipo de extracto. Para el hexánico se utilizó Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) con un cromatógrafo de gases Agilen Technologies 6850 con una columna capilar HP-5MS (30m x 0.250mm; espesor de la película 0.25 mm) y para el metanólico se realizó una Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC) con una columna Discovery C-18.

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)

El Contenido de Fenoles Totales (CFT) se realizó con base al método de Singleton *et al.*, 1999 (Apéndice VI). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 y 0.12 mg/mL. La concentración que se utilizó para el extracto fue de 0.05 mg/mL, la absorbancia del extracto evaluado se interpoló con la curva de calibración del ácido gálico.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se evaluó con el método de reducción del radical 2,2-diphenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Se determinó la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) utilizando las siguientes concentraciones para el extracto: 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/mL (Apéndice VII). Como control positivo se utilizó quercetina a las mismas condiciones que el extracto pero con las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 µg/mL. Como control negativo se utilizaron pozos con 200 µL de metanol (MeOH) grado HPLC (Okusa *et al.*, 2007).

TOXICIDAD GENERAL

Se determinó la Concentración Letal Media (CL₅₀) con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach), usando concentraciones de: 1000, 100 y 10 µg/mL con tres repeticiones cada una (Apéndice IX). Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) (McLaughlin, 1991; McLaughlin y Rouges, 1998).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el CFT, la evaluación de DPPH y la Toxicidad General se realizaron análisis de regresión lineal utilizando Excel.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

COLECTA DE LA PLANTA Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Tabla 1. Datos etnobotánicos de *L. oaxacana*.

Nombre común	Salve Real
Nombre científico	<i>Lippia oaxacana</i>
Zona de colecta	Acatepec, Puebla. 18° 12' 22.22" N y 97° 34' 16.8" W y a 1574 msnm
Fecha de colecta	08 febrero del 2015
Uso	Para tratar enfermedades gastrointestinales y para ayudar a sanar a las mujeres después del parto
Forma de uso	Tés y como agua de baño
Colector	Héctor Cervantes
No. colecta	HCM137

Se proporcionó un ejemplar al Herbario IZTA para su identificación y número de colecta (Tabla 1). Se obtuvieron 130.3 g de planta seca de *L. oaxacana*.

En cuanto al rendimiento de los extractos obtenidos, el extracto metanólico tuvo un mayor rendimiento (8.87%) que el hexánico (0.46%) (Tabla 2) a partir de 130.3 g de planta seca, dando a entender que la planta posee una cantidad de metabolitos secundarios polares mayor que los no polares.

Tabla 2. Rendimiento de los extractos obtenidos de *L. oaxacana*.

Extracto	g	%(*)
Metanol	11.56	8.87
Hexano	0.6	0.46

(*) El porcentaje fue calculado con respecto a los 130.3 g obtenidos de la planta seca.

EVALUACIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se observó que ambos extractos mostraron actividad sobre seis cepas, de las 20 cepas evaluadas. Cabe mencionar que ambos extractos inhibieron la misma cantidad de cepas Gram positivas que Gram negativas.

Éstas fueron *S. aureus* (CUSI, CC, FES-C) como la cepa Gram positiva, y tres cepas Gram negativas (*V. cholerae* ATCC 39540, *K. pneumoniae* ATCC 13883, y *S. enterica* ATCC 7251). De estas, la cepa con mayores halos de inhibición fue *V. cholerae* (con 8.0 ± 0.5 mm en el extracto metanólico, y 6.33 ± 0.28 mm en el extracto hexánico) y la cepa con halos menores fue *K. pneumoniae* y *S. enterica* (con 6.0 ± 0.0 mm en ambos extractos para cada cepa) (Figura 3).

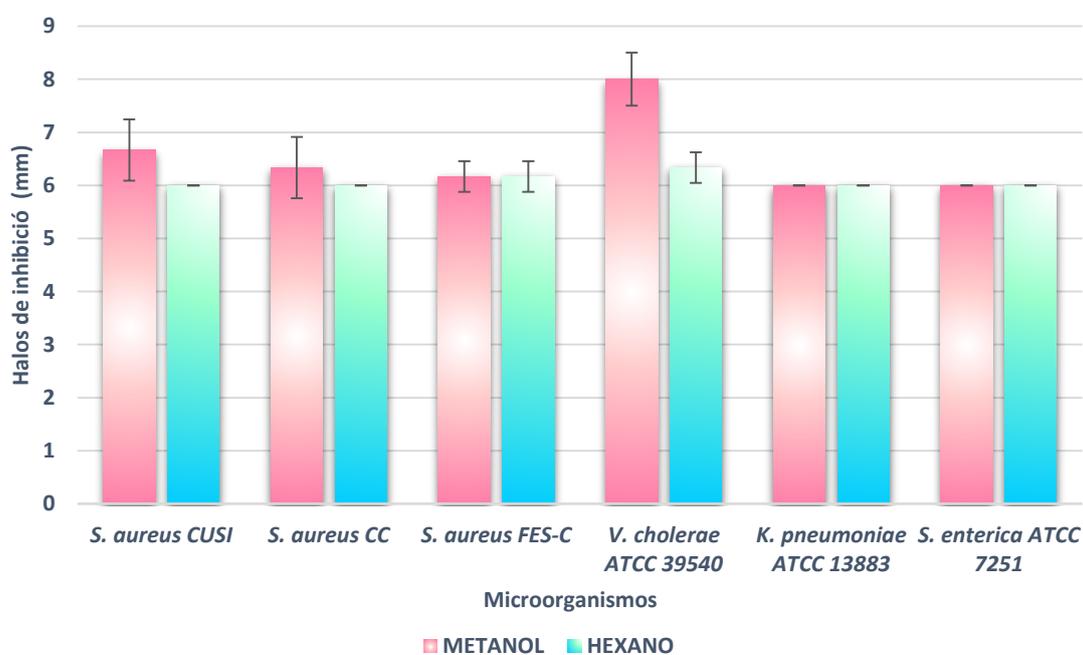


Figura 3. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de *L. oxacana*. Halos de inhibición en mm \pm DE. Valores promedio de tres repeticiones.

Para la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana (Tabla 3) se puede observar que la cepa Gram positiva que mostró una CMI y CBM más baja fueron los tres tipos de *S. aureus*, con 1.5 y 2.0 mg/mL para el extracto metanólico, mientras que para el extracto hexánico fueron valores de 1.0 y 1.5 mg/mL, respectivamente. La cepa Gram negativa con la CMI y CBM más bajas fue *K. pneumoniae* con valores de 1.0 y 1.5 mg/mL para el extracto metanólico.

Esta misma cepa obtuvo los valores más bajos de CMI y CBM en el extracto hexánico, con valores de 0.25 y 0.5 mg/mL.

Tabla 3. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los extractos de *L. oaxacana*.

CEPAS	METANOL (mg/mL)		HEXANO (mg/mL)	
	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. aureus</i> cc	1.5	2.0	1.0	1.5
<i>S. aureus</i> CUSI	1.5	2.0	1.0	1.5
<i>S. aureus</i> FES Cuautitlán	1.5	2.0	1.5	2.0
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	1.0	1.5	1.5	2.0
<i>V. cholerae</i>	1.0	1.5	1.5	2.0
<i>K. pneumoniae</i>	1.0	1.5	0.25	0.5

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; CBM: Concentración Bactericida Mínima.

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

En la figura 4 se puede observar el efecto del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de *S. aureus*. El comportamiento de la población bacteriana al ser expuesta a la CBM va en aumento durante la primera hora, de 3.51 a 3.59 Log UFC/mL, y pasadas las 24 horas se reduce hasta 1.30 Log UFC/mL, mostrando un efecto bacteriostático. La población bacteriana expuesta a la CMI muestra un comportamiento similar pues durante las primeras horas va en aumento, de 3.41 a 3.99 Log UFC/mL, pero pasadas las 24 horas disminuye hasta 3.70 Log UFC/mL. La población bacteriana expuesta a $\frac{1}{2}$ CMI y el testigo se comportan de manera muy similar, éstas van en aumento desde el tiempo cero hasta pasadas las 24 horas.

La CBM es la concentración a la cual se logra detener el crecimiento bacteriano en un 99.99%, mientras que la CMI es aquella concentración a la cual se nota una drástica inhibición del crecimiento bacteriano.

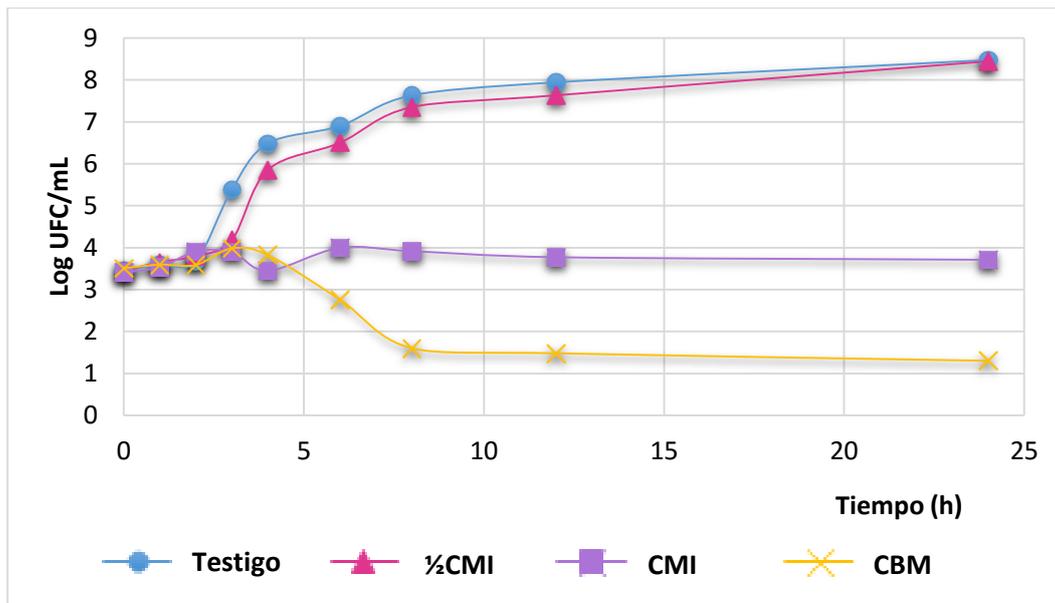


Figura 4. Comportamiento de las concentraciones del extracto metanólico de *L. oaxacana* probadas en la cepa *S. aureus* durante 24 horas. Testigo= Sin extracto, 1/2 CMI= 0.75 mg/mL, CMI= 1.5 mg/mL y CBM= 2.0 mg/mL.

La población bacteriana expuesta a la CBM del extracto metanólico sobre *K. pneumoniae* (Figura 5) muestra un crecimiento constante las primeras seis horas, de 3.45 a 3.59 Log UFC/mL. Pasadas las ocho horas se ve un incremento que va hasta 5.99 Log UFC/mL, a las 24 horas se tiene 7.74 Log UFC/mL, demostrando un efecto bacteriostático. El Log UFC/mL de la CMI aumenta de forma muy similar a la 1/2 CMI y el testigo.

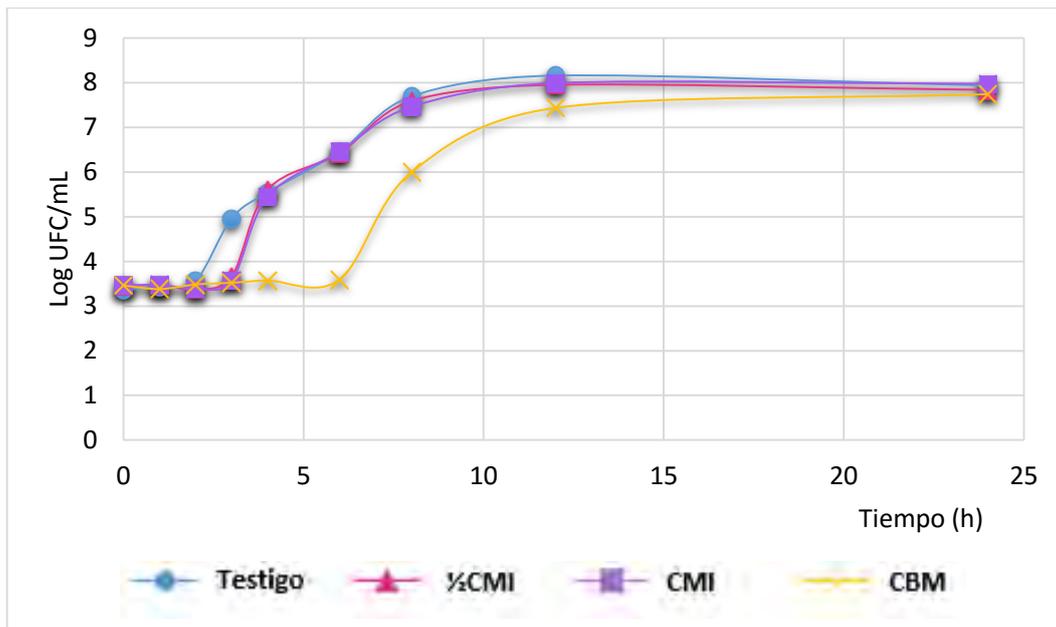


Figura 5. Comportamiento de las concentraciones del extracto metanólico de *L. oaxacana* probadas en la cepa *K. pneumoniae* durante 24 horas. Testigo= Sin extracto, 1/2CMI=0.5 mg/mL, CMI= 1.0 mg/mL y CBM= 1.5 mg/mL.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

El extracto metanólico de *L. oaxacana* fue el único que presentó actividad sobre un hongo miceliado (*Fusarium sporotrichum*). Ninguno de los dos extractos probados mostraron actividad sobre cepas levaduriformes.

En esta cepa se procedió a determinar la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) del extracto metanólico, esta significa la concentración a la cual se inhibe el crecimiento del 50% en el desarrollo del organismo. Así se obtuvo una CF₅₀ de 1.4 mg/mL para el extracto metanólico (Figura 6).

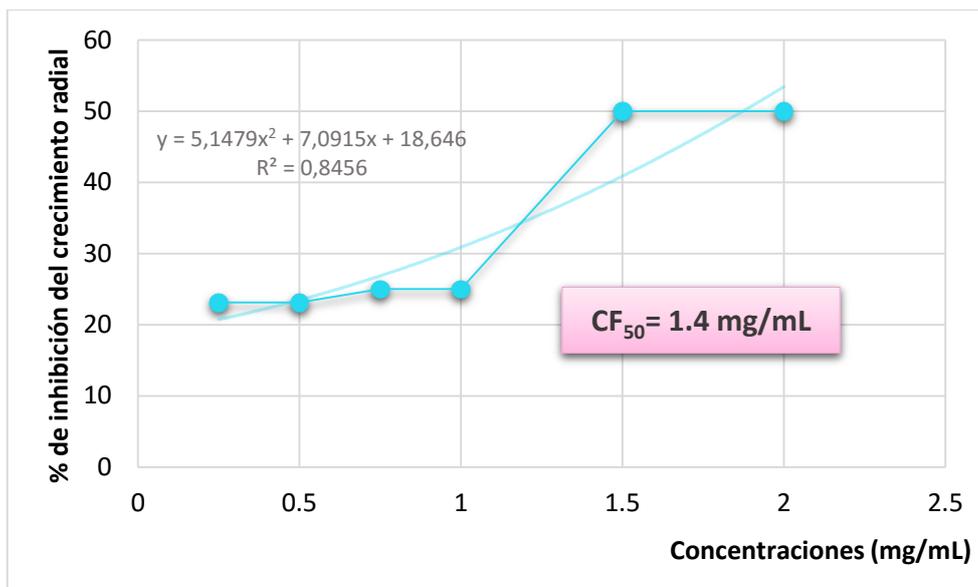


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *F. sporotrichum* con las distintas concentraciones del extracto metanólico de *L. oaxacana*.

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA.

En la caracterización fitoquímica (Tabla 4) se detectó la presencia de fenoles y taninos en el extracto metanólico, mientras que para el extracto hexánico se detectó la presencia de glicósidos y terpenos.

Tabla 4. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos metanólico y hexánico de *L. oaxacana*.

Metabolito Secundario	Metanol	Hexano
Glicósidos	X	O
Fenoles	O	X
Alcaloides	X	X
Terpenos	X	O
Saponinas	X	X
Taninos	O ^c	X
Cumarinas	X	X
Esteroides y Triterpenos	X	X

O= presencia, O^c= presencia de taninos condensados; X= ausencia.

Esta caracterización se corroboró sometiendo ambos extractos a pruebas cromatográficas específicas. Para el metanólico se realizó una Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC), en donde se identificaron 12 compuestos (Figura 7) de los cuales siete son fenilpropanoides (78.50%) y 5 flavonoides (21.50%) (Tabla 5).

Para el extracto hexánico se realizó una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Los resultados obtenidos muestran que el extracto posee seis compuestos (Tabla 6), estos fueron cotejados con la base de datos NIST MS Search 2.0.

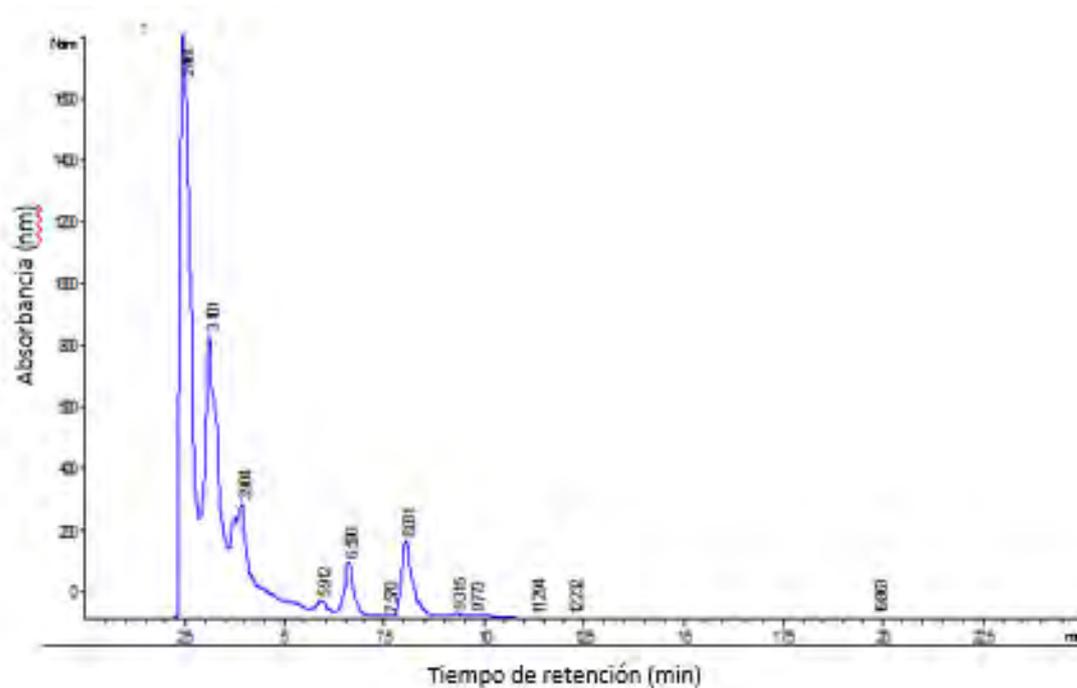


Figura 7. Cromatograma del extracto metanólico de *L. oaxacana* obtenido en HPLC, medido a una longitud de onda de 280 nm.

Tabla 5. Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) del extracto metanólico de *L. oaxacana*.

#	TR	% área	λ Máxima	Tipo
1	2.461	38.497	220	Fenilpropanoide
2	3.101	25.281	218, 332	Fenilpropanoide
3	3.904	18.709	250, 270, 342	Flavonoide
4	5.912	1.994	268, 344	Fenilpropanoide
5	6.59	4.79	266	Fenilpropanoide
6	7.57	0.347	274, 332, 345	Flavonoide
7	8.031	6.661	246, 282	Fenilpropanoide
8	9.315	1.038	246, 272, 344	Flavonoide
9	9.773	1.395	250, 286, 342	Flavonoide
10	11.294	0.269	280	Fenilpropanoide
11	12.232	1.01	328, 364	Fenilpropanoide
12	19.863	0.008	234, 284, 340	Flavonoide

Tabla 6. Compuestos identificados en el extracto hexánico de *L. oaxacana* a través de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

Compuesto	Tiempo retención (s)	Abundancia (%)	Fórmula
Eicosano	16.617	41.72	C ₂₀ H ₄₂
Ácido pentadecanoico, 14-metil éster metílico	14.737	6.28	NE
Ácido Hexadecanóico, éster metílico	14.737	3.50	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Eugenol	10.272	3.03	(C ₁₀ H ₁₂ O ₂)
Ácido n-Hexadecanoico	14.974	2.64	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
2-Pentadecanona, 6,10,14-trimetil	14.172	1.01	C ₁₈ H ₃₆ O
TOTAL		58.18	

*NE: No encontrado

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)

El extracto metanólico de *L. oaxacana* contiene 197.197 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, esto es un 19.72% de fenoles totales.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la evaluación de la actividad antioxidante se obtuvo, para el control positivo (quercetina), una CA₅₀ de 6.06 µg/mL (Figura 8), mientras que para el extracto metanólico de *L. oaxacana* se obtuvo una CA₅₀ de 4.17 µg/mL (Figura 9).

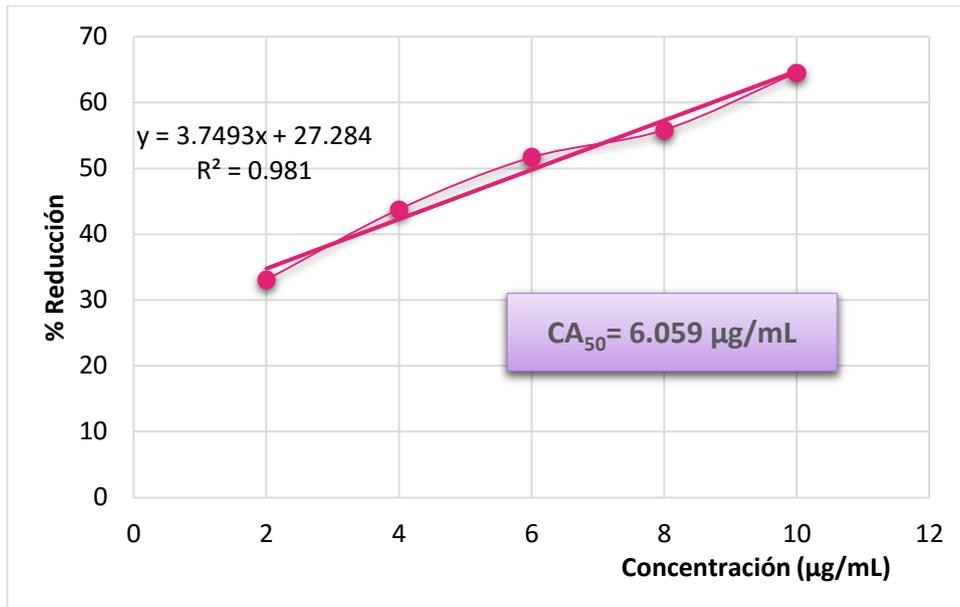


Figura 8. Actividad antioxidante del control positivo (Quercetina), sobre el radical DPPH.

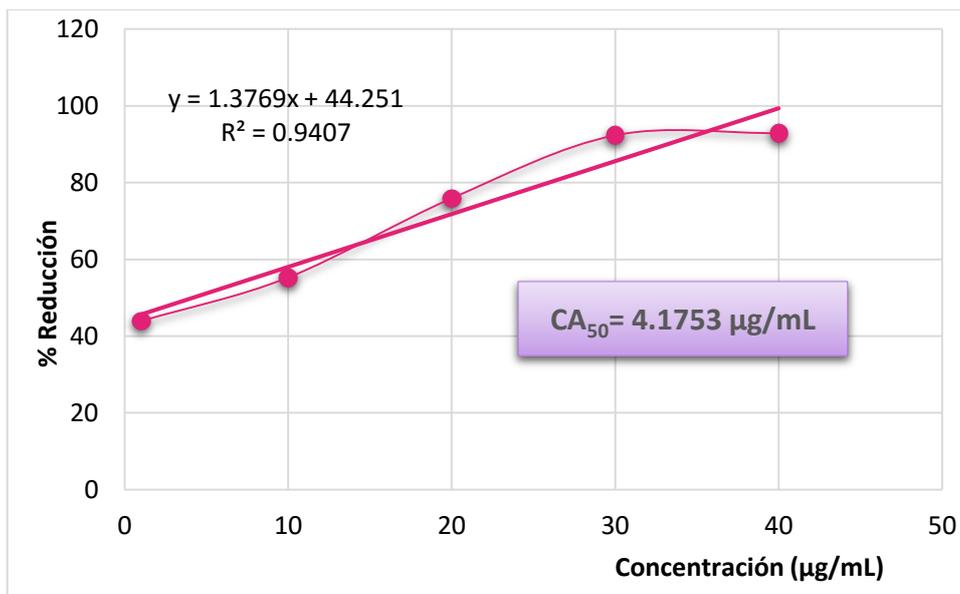


Figura 9. Actividad antioxidante del extracto metanólico de *L. oaxcana*, sobre el radical DPPH.

TOXICIDAD GENERAL

Para la prueba de toxicidad general se obtuvo del extracto metanólico una CL_{50} de 56.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10). De acuerdo a la escala tomada de Jorge y Pino en el 2010 (Tabla 7) se determinó que el extracto es muy tóxico.

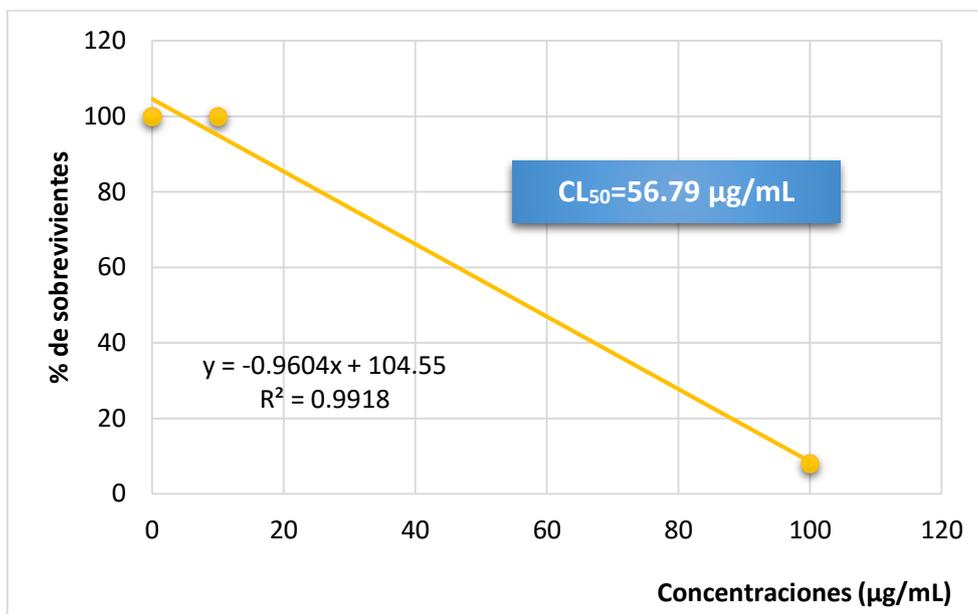


Figura 10. Evaluación de la toxicidad general del extracto metanólico de *L. oaxacana* en larvas nauplio II de *A. salina*.

Tabla 7. Escala de toxicidad en larvas nauplio de *A. salina*.

Escala	Rango
Extremadamente tóxico	$CL_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$
Muy tóxico	$10 > CL_{50} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$
Moderadamente tóxico	$100 > CL_{50} < 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$
No tóxico	$CL_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$

*Escala tomada de Jorge y Pino, 2010.

DISCUSIÓN

El conocimiento de las propiedades químicas de los extractos obtenidos de las plantas, permite proponer a estos productos como fuente alternativa y natural de compuestos útiles en la farmacología (Stashenko *et al.*, 2003). Dentro de las plantas con características medicinales del país, pertenecientes a la familia Verbenaceae, se encuentran aquellas del género *Lippia*. Algunas especies de plantas que se encuentran dentro de éste género han sido ampliamente estudiadas (Stashenko *et al.*, 2003), a pesar de esto aún hay especies dentro de este género que no han sido estudiadas por sus propiedades medicinales, este es el caso de *Lippia oaxacana*.

Obtención de extractos y rendimientos

Los resultados obtenidos para los rendimientos de los extractos probados (Tabla 2) sugieren que la mayor parte de los componentes de la planta son de naturaleza polar, pues el mayor rendimiento obtenido fue para el extracto metanólico (8.87%) comparado con el hexánico (0.46%).

La composición de los extractos está sujeta a variables tales como: técnica de extracción, tratamiento o almacenamiento del material vegetal y condiciones geobotánicas de crecimiento. Estas diferencias también pueden deberse a la época en la que la planta fue colectada, la parte que se utilizó para la obtención de los extractos, la etapa de crecimiento de ésta o las condiciones en las que estaba desarrollándose (Ruiz *et al.*, 2007).

Un punto importante al momento de obtener la planta, y no alterar de manera drástica la composición de los principios activos, es la conservación del material vegetal. Lo más recomendado es mantenerlas en un lugar fresco ya que la temperatura alta produce una pérdida sobre los principios activos. También se recomienda aislar de la atmósfera ya que el aire provoca un mayor enranciamiento de las grasas. Los principios activos de las plantas no se pueden conservar indefinidamente, en general no se debe sobrepasar el año de conservación. Aquellas plantas con compuestos volátiles se pueden almacenar generalmente menos de un año (Osorio, 2009). Para el caso de *L.*

oaxacana, esto último podría explicar el rendimiento del extracto hexánico ya que éste obtiene mayormente compuestos no polares como muchas grasas. Además el género *Lippia* es reconocido por sus altas concentraciones de compuestos volátiles (Stashenko *et al.*, 2003; Medina-López *et al.*, 2011).

Evaluación de la Actividad Antibacteriana.

Los resultados de la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana (Figura 3) muestran que ambos extractos son activos sobre cepas Gram negativas (*S. enterica*, *K. pneumoniae* y *V. cholerae*) y Gram positivas (tres tipos de *S. aureus*). Esto concuerda con lo reportado por Hernández y colaboradores en el 2003 donde los extractos hexánico y clorofórmico de *L. oxacana* también tuvieron actividad sobre estas mismas cepas.

Sena-Filho y colaboradores en el 2006 utilizaron extractos polares, ellos concluyen que el extracto etanólico y metanólico de las raíces de *L. alba* lograron inhibir el crecimiento precisamente de estas dos cepas, *S. aureus* y *K. pneumoniae*. La primera obtuvo una CMI de 1.0 y 2.0 mg/mL para los respectivos extractos, mientras *K. pneumoniae* tuvo una CMI de 2 mg/mL para ambos extractos. Estos son valores muy cercanos a los obtenidos en este trabajo (Tabla 3) (CMI del extracto metanólico para *S. aureus*= 1.5 mg/mL, CMI del hexánico= 1.0 mg/mL; CMI del extracto metanólico para *K. pneumoniae*= 1.0 mg/mL, CMI del hexánico= 0.25 mg/mL).

La inhibición de las cepas Gram negativas pudo deberse a que los extractos poseen grupos de metabolitos secundarios que penetran a la bacteria hasta afectar su DNA o la síntesis de enzimas o proteínas (Sepúlveda-Jiménez, 2004). Se sabe que las bacterias Gram positivas poseen una membrana celular y una capa gruesa de peptidoglucano, mientras que las Gram negativas poseen doble membrana celular separada por una capa delgada de peptidoglucano la cuál le da una resistencia a agentes antimicrobianos (Macarulla y Goñi, 1994).

Evaluación de la actividad antifúngica.

Los extractos probados no presentaron actividad sobre hongos levaduriformes, el extracto metanólico posee actividad sobre *F. sporotrichum*. Es importante destacar que el género *Fusarium* es conocido por su capacidad de causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos con una alta mortalidad. Algunas de sus especies producen toxinas que afectan al ser humano y a los animales. Se ha encontrado *F. sporotrichum* en la parte superficial de los quesos elaborados artesanalmente (Vasek *et al.*, 2004).

Dentro de los antifúngicos existe una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. Algunos afectan la membrana celular, la pared, la síntesis de proteínas, RNA, o bien inhiben enzimas, por mencionar algunos (Gregori, 2005).

La gran similitud entre las células de los mamíferos y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar el posible antifúngico, pues este debe ser selectivo entre la célula patógena y la célula humana sana. El mecanismo de acción de muchos medicamentos antifúngicos depende del lugar que afecten, lo cual está relacionado con la estructura del antifúngico (Aveñanos, 1997).

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad que da forma a la célula, controla su permeabilidad y la protege de cambios osmóticos; además constituye el lugar de interacción con el medio externo al ser el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel importante en el desarrollo de la acción patógena del organismo. Esta estructura es esencial para los hongos y su eliminación o alteración en ella tienen efectos en el crecimiento y morfología del hongo llegando a causar muerte por lisis. Por esta razón, la pared celular es considerada un punto clave para la acción de los fármacos antifúngicos. La pared celular de estos hongos está compuesta principalmente por polisacáridos como quitina, glucano y el manano; también por glicoproteínas dando lugar a una estructura rígida (Pontón, 2008).

La membrana de los hongos miceliados está formada por ergosterol, este es el esteroide producido en mayor cantidad por los hongos y está relacionado con el crecimiento del organismo. Este esteroide, al estar ausente en las células

animales, lo convierte en un blanco útil para los antibióticos (Pitt y Hocking, 1997).

Los extractos probados en este trabajo no presentaron actividad antifúngica posiblemente debido a las estructuras de los metabolitos secundarios que posee cada uno, estos últimos difieren con las estructuras de los antifúngicos comerciales. La gran mayoría de los fármacos usados en el tratamiento de las enfermedades causadas por hongos poseen estructuras complejas. Muchos poseen anillos nitrogenados (flucitosina, ketoconazol, voriconazol, itraconazol, etc), son cadenas de carbono muy largas capaces de interactuar con el ergosterol (anfotericina B) o poseen ambas características (micafungina, lipopéptidos, etc) lo que se favorece su unión o penetración al hongo, dependiendo los puntos de acción de estos (Gregori, 2005).

Caracterización Fitoquímica.

Los grupos de metabolitos secundarios fueron identificados de manera cualitativa mediante ensayos de coloración para ambos extractos probados (Tabla 4). En el extracto metanólico se identificaron fenoles, taninos y flavonoides, mientras que en el hexánico se identificaron terpenos, glicósidos y flavonoides. Vera y colaboradores, en el 2007, reportaron en su trabajo la caracterización fitoquímica de macerados metanólicos y aceite esencial de *L. alba* encontrando taninos y flavonoides en todos ellos. Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo ya que en el extracto metanólico también se identificaron taninos y flavonoides. Henao y colaboradores en el 2009 realizaron la caracterización fitoquímica de los extractos hexánico, diclorometánico y etanólico, identificando glicósidos cardiotónicos en los tres. Además en el extracto etanólico también identificaron taninos y flavonoides, coincidiendo con los grupos de metabolitos secundarios que se obtuvieron en ambos extractos probados para este trabajo.

Los resultados obtenidos en el análisis por HPLC (Figura 7) se midieron a una longitud de onda de 280 nm, ya que en esta región del espectro de UV es posible detectar compuestos con dobles ligaduras conjugadas como los flavonoides y fenilpropanoides. En el extracto metanólico se identificaron 12

compuestos, de los cuales el 78.5% son fenilpropanoides y el 21.5% son flavonoides (Tabla 5). Esta identificación preliminar es con base a los tiempos de retención y su espectro de absorción en UV. García-Pérez y colaboradores en el 2012 reportan en *L. graveolens* cuatro compuestos de tipo flavonoides como luteolina, taxifolina, quercetina y naringenina; y dos de tipo fenilpropanoides como eriodictiol y galangina. Los autores del trabajo mencionado atribuyen a estos compuestos diferentes propiedades como antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, etcétera.

Los fenoles son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen como mínimo un grupo fenol, un anillo aromático unido a, al menos, un grupo funcional hidroxilo. Dentro de este grupo derivan los flavonoides y fenilpropanoides. Los flavonoides contienen 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. En sus funciones están la defensa y la pigmentación de la planta. Los fenilpropanoides contienen un anillo de benceno y una cadena lateral de tres carbonos. Generalmente los fenilpropanoides (o ácidos fenólicos) están en mayor concentración que los flavonoides. Los fenilpropanoides la mayoría de las veces están esterificados, lo que los hace más lipofílicos facilitando el transporte al interior de la célula (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Esto último quizá explique por qué el extracto metanólico tuvo actividad antibacteriana ya que estos compuestos pudieron atravesar las membranas lipídicas de las cepas bacterianas.

Para el análisis de CG-EM realizado en el extracto hexánico se obtuvieron ocho compuestos (Tabla 6) entre ellos se encuentra el Eugenol. Este compuesto ha sido reportado por varios autores en diversas especies del género *Lippia*. Por ejemplo el trabajo realizado por Stashenko y colaboradores en el 2014 reportan este compuesto en los aceites esenciales de siete especies diferentes de *Lippia* analizados en una CG-EM. También Viljoen y colaboradores en el 2004 reportan este compuesto en el aceite esencial de las hojas de la especie *L. javanica*. En trabajos realizados por Lawrence y colaboradores en 1972 con especies de plantas como *O. tenuiflorum* L. y *O. basilicum* L. reportan la presencia de este compuesto al que se le atribuye propiedades antimicrobianas. El eugenol es un derivado fenólico que en altas concentraciones puede tener un efecto bactericida (10^{-2} a 10^{-3} mol/L), acción

que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de las proteínas, lo que resulta en daño a la membrana celular. Los efectos farmacológicos del eugenol son complejos y dependen de la concentración o de las combinaciones (p. e. eugenol-timol, eugenol-carvacrol) en las que se aplique (González, 2002). Esto podría explicar los resultados en la actividad antibacteriana donde se muestra que el extracto hexánico también tuvo actividad.

Actividad Antioxidante y Contenido de Fenoles Totales (CFT).

Los compuestos fenólicos son un grupo de compuestos presentes en diversas especies vegetales en los que ejercen una potente acción antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células vegetales. La capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos (Avello y Suwalsky, 2006).

En la prueba de actividad antioxidante el extracto metanólico de *L. oaxacana* obtuvo un valor de 4.17 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9) el cual es menor al control positivo que tuvo un valor de 6.06 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8) mostrando que el extracto posee una buena capacidad antioxidante. El extracto metanólico de *L. oaxacana* dio positivo a fenoles (Tabla 4 y 5) además de obtener un valor de 19.72% (197.197 mg equivalentes de ácido gálico/g del extracto) en el análisis de CFT. Al poseer flavonoides (compuestos fenólicos) se les puede atribuir la actividad antioxidante. Esto no coincide con el trabajo realizado por Reyna en el 2015 donde evalúa la actividad antioxidante del extracto metanólico de *L. graveolens* reportando un valor de $\text{CA}_{50} = 32 \mu\text{g/mL}$. Esto confirma que el extracto probado en este trabajo tiene un fuerte potencial antioxidante frente al radical DPPH.

Los componentes fenólicos constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios presentes en las plantas, dentro de este se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides. Existe un gran interés de estudio en este grupo por sus propiedades antioxidantes. Su comportamiento antioxidantes parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009).

Toxicidad General.

Los resultados obtenidos para la prueba de toxicidad general (Figura 10) mostraron que el extracto metanólico resultó ser muy tóxico (56.79 µg/mL) según la escala establecida por Pino y Jorge en el 2010 (Tabla 7). Esto puede ser posible porque contiene grupos de metabolitos secundarios fenólicos como los taninos.

Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular y tienen propiedades para precipitar sustancias como proteínas, alcaloides, ácidos nucleicos, esteroides, saponinas y carbohidratos. Los taninos han sido empleados para la preservación de la piel destinada al cuero y para dar astringencia a productos como el té y el vino (Waghorn, 2007). De estos derivan dos grupos, taninos condensados e hidrolizables. Estos compuestos son utilizados en las plantas para diversas funciones como protección a heridas por insectos o herbivoría (Márquez y Suárez, 2008). El uso de los taninos condensados en la alimentación de los rumiantes ha demostrado que éstos metabolitos poseen características benéficas en concentraciones del 2-4% pero en concentraciones mayores a 5% o 10% producen efectos negativos y hasta tóxicos (Otero e Hidalgo, 2004).

Esto puede explicar el por qué el extracto metanólico resultó ser muy tóxico pues éste posee taninos condensados. Como se menciona antes, concentraciones mayores al 5% pueden ser tóxicas pero concentraciones menores a 4% parecen no ser perjudiciales. Sin embargo se recomienda seguir estudiándolos para establecer con más seguridad los efectos y las concentraciones requeridas para no provocar efectos negativos.

El ensayo de *A. salina* ha demostrado ser un modelo conveniente y rápido para pruebas de toxicidad preliminares. Además, este ensayo es de bajo costo comparado con otros, poco complicado, manipulable (temperatura, composición y salinidad del medio y edad de las larvas), esto a la vez la hace reproducible. Tampoco requiere equipo específico o técnicas de asepsia (McLaughlin, 1991; Hartl y Humpf, 2000). Así, un número significativo de especies de plantas con actividad antitumoral que muestran actividad citotóxica, se pueden monitorear usando el modelo de *A. salina* en vez de

modelos *in vivo* o *in vitro* que son muy costosos y complejos. El uso del modelo con la larva nauplio de *A. salina* se ve favorecido ya que en ese estadio la larva no requiere alimento, asegurando que el efecto tóxico que pudiera tener el extracto es debido a la absorción que se da a través de su cuerpo, que carece de exoesqueleto, y no por una ingesta directa de lo que se encuentra en su medio. Una ventaja más es que con este modelo no se requieren sueros de animales y no se han recibido críticas por los defensores de los derechos de los animales al usar estos crustáceos (McLaughlin, 1991).

Conclusiones.

- Los extractos de *L. oaxacana* tiene actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y cepas Gram negativas.
- Las CBM evaluadas en las dos cepas bacterianas (una Gram positiva y una Gram negativa) mostraron un efecto bacteriostático.
- Los extractos de *L. oaxacana* no poseen actividad antifúngica, sólo el extracto metanólico mostró actividad sobre *F. sporotrichum*.
- El extracto hexánico posee glicósidos y terpenos. El extracto metanólico posee fenoles y taninos.
- La evaluación del extracto metanólico en HPLC permitió observar que el extracto contiene 12 compuestos, de los cuales un 78.5% son de tipo fenilpropanoide y un 21.5% son de tipo flavonoide.
- El extracto metanólico de *L. oaxacana* tiene un fuerte potencial antioxidante frente al radical DPPH ($CA_{50} = 4.17 \mu\text{g/mL}$) el cual es mejor al control positivo ($CA_{50} = 6.06 \mu\text{g/mL}$), además de obtener un valor de CFT= 19.72%.
- El extracto metanólico es muy tóxico ($CL_{50} = 56.79 \mu\text{g/mL}$).
- Con el presente trabajo se confirma la actividad antibacteriana y antioxidante de *L. oaxacana*.

APÉNDICES.

I. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer

(Koneman *et al.*, 1996)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos vegetales, el método es el siguiente:

Se utiliza agar Müller-Hinton (Bioxon) ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas. El medio debe alcanzar en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los compuestos 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 compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo se prepara tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias con un asa de siembra, se sumerge en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa. El tubo con la bacteria se incuba a 37°C durante 24 horas o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL.

Posterior a esto se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión de bacteria, 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 con el agar que previamente se dejó solidificar. Finalmente se siembra mediante estría en tres direcciones dando vueltas a la placa en ángulos aproximados de 60° luego de cada estría.

Se utilizan sensidiscos de 5mm de diámetro hechos de papel Whatman No. 5. Con 2 mg de cada extracto a probar disuelto en 10 mL del disolvente correspondiente a cada uno, se impregnan los sensidiscos y se colocan en la superficie del agar utilizando una pinza estéril y se ponen por los menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la caja. Los

sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados.

Para el control negativo se preparan sensidiscos con 10 μL del solvente empleado para disolver el extracto. Para el control positivo se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con 25 μg de cloranfenicol. Todos los sensidiscos se preparan con 24 horas de anticipación.

Una vez preparadas convenientemente las cajas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36°C , sin mayor tensión de CO_2 . Es preciso evitar presión de CO_2 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 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.

En el caso de existir zonas de inhibición, se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

II. Método de dilución en agar

(Koneman *et al.*, 1996)

Para estos bioensayos se evalúan diferentes concentraciones de los extractos que resultan con actividad antibacteriana en la prueba cualitativa para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). Las concentraciones evaluadas fueron: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL. En cada caja se colocaron 6mL de agar con la concentración del extracto correspondiente.

Para ello se prepara una solución patrón y con base en esta se toman alícuotas correspondientes con la finalidad de obtener las concentraciones antes señaladas. Una vez agregada cada concentración del extracto la mezcla se agita rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocan en cajas Petri.

El inóculo consiste en una suspensión bacteriana con una concentración de 1.5×10^8 bacterias por mL. Se toma el inóculo igual que la forma anteriormente descrita; este se coloca sobre las cajas con los extractos a diferentes concentraciones tocando la superficie del agar únicamente por punteo tres veces para cada cepa bacteriana en la misma caja. Este procedimiento corresponde a las tres repeticiones. Todas las cepas a evaluar se ponen en una caja para cada concentración.

Como control positivo se utilizan cajas sin extracto con 6mL de caldo Müller Hinton. Como control negativo se usan cajas con 6mL de caldo Müller Hinton con 50 μ L del solvente empleado para disolver el problema.

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento bacteriano representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración en la que se produce una inhibición de la población del 99.99% representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

III. Efecto de los extractos sobre el crecimiento bacteriano.

(Kubo *et al.*, 1993, citado en Ávila, 1996)

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

Se utiliza como medio de cultivo el agar Müeller-Hinton. Este se coloca en cajas Petri septadas.

Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müeller-Hinton.

Con una micropipeta se inoculan 0.1 mL de la suspensión de bacteria en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se incuba en una estufa a 35°C sin presión de CO₂.

Los extractos o compuestos a evaluar se preparan en tubos con 10 mL de caldo Müeller-Hinton con las concentraciones de $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM. Se muestrea cada hora durante los primeros cinco tiempos: T₀-0, T₁-1, T₂-2, T₃-3, T₄-4 y T₅-5 (tiempo-horas transcurridas), después dos muestreos cada dos horas, luego un muestreo a las 12 horas y finalmente uno a las 24 horas. En cada tiempo se realizan dos diluciones de 50 µL en tubos con 5 mL de solución salina para determinar las UFC en uno. Como testigo se prepara un tubo sin extracto.

Las cajas se incuban durante 24 horas a 35°C. 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 bacteriana, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

IV. Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar.

(Wang y Bun, 2002)

Con este ensayo se evalúa cualitativamente la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos del extracto. Los compuestos difunden a través del agar y, si estos son activos, el crecimiento del hongo es más lento o se detiene, resultando la deformación de la colonia.

Se lleva a cabo en caja Petri con 20 mL de agar de papa-dextrosa (PDA), en el cual se pone un botón con el micelio del hongo en crecimiento.

Utilizando sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5 se impregnan con 2 mg del extracto disueltos en 10 μ L del solvente correspondiente. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo para dejar que el disolvente se evapore por completo. Los discos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial, utilizando una pinza estéril.

Como control negativo se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L de solvente y como control positivo se usan sensidiscos con 7 μ g de ketoconazol. Se realizan tres repeticiones para cada extracto por cepa de hongo.

Las cajas se incuban a 28°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

En el caso de existir alguna deformación en el crecimiento del hongo, se reporta el extracto como activo ya que en condiciones normales el crecimiento del hongo es circular y éste debe crecer encima de los sensidiscos como con el control negativo, también cualquier signo de diferencia de color, esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

V. Determinación de la concentración fungicida media (CF₅₀)

(Wang y Bun, 2002)

Se mide el efecto sobre los hongos filamentosos del extracto. Con cajas de 24 pozos se preparan con el compuesto incorporándolo en el agar a determinadas concentraciones. En cada pozo se coloca 1.5 mL de agar papa-dextrosa (PDA), con las siguientes concentraciones del compuesto a evaluar: 2, 1.5, 1, 0.75, 0.50 y 0.25 mg/mL. Posteriormente se coloca una pequeña cantidad de micelio en el centro de cada pozo. Esto se realiza por triplicado.

Para el control negativo se le agrega al agar el mayor volumen de solvente usado en los grupos experimentales y se emplea un grupo testigo para comparar la velocidad de crecimiento.

Las placas son incubadas a 28°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Se mide el crecimiento del hongo y se realiza una gráfica dosis-respuesta, en la que la respuesta es el porcentaje de inhibición, tomando en cuenta que el grupo testigo es el 0% de inhibición.

La concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la Concentración Fungicida Mínima (CFM); mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la Concentración Fungicida Media (CF₅₀).

VI. Contenido de Fenoles Totales (CFT)

(Método modificado por Singleton *et al.*, 1999)

Esta se mide por espectrofotometría en base a una reacción colorimétrica de óxido reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6⁺. La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5⁺ y 6⁺ formando una solución azul.

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

Primero se realiza una solución estándar de ácido gálico de 10-60 mg/L. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico de 0.0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 mg/mL; a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener un volumen final de 1 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto se prepara una solución estándar a una concentración de 0.1 mg/mL. Se toma una alícuota de 100 µL de esta y se agregan 900 µL de agua destilada para obtener un volumen final de 1 mL.

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada, se añaden 1.5 mL de una solución de Na₂CO₃ (200 mg/L) 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 realiza por triplicado y se obtiene el promedio de cada una.

Finalmente 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 evaluada. Los resultados se expresan como miligramos de equivalentes de ácido gálico/ gramos de extracto (mg de EAC/g de extracto) o bien en porcentaje.

VII. Reducción del radical 2,2-diphenil-1-Picrilhidracilo (DPPH).

(Okusa *et al.*, 2007).

Se realizó la técnica de reducción del radical 2,2-Diphenil-1-Picrilhidracil (DPPH) para determinar la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) del extracto metanólico.

La actividad antioxidante de un extracto se determina mediante la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) que quiere decir la concentración del extracto a la cual se neutraliza el 50% de los radicales libres. Por lo tanto, la CA₅₀ obtenida se considera inversamente proporcional a la capacidad antioxidante.

Para preparar la solución STOCK se utilizaron 5 mg del extracto metanólico en 5 mL de MeOH grado HPLC para obtener las concentraciones de 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/mL, mientras la solución de DPPH se preparó pesando 2 mg del reactivo en un matraz color ámbar aforado a 50 mL con MeOH para obtenerlo a una concentración de 100 µM.

En una placa de Elisa se agregan 50 µL de la solución problema a las diferentes concentraciones (1-100 µg/mL) por triplicado, posteriormente se agregan 150 µL de la solución de DPPH. Con el control negativo se llenan también tres pozos con 200 µL de MeOH. Para el control positivo se usa la DPPH a las mismas condiciones que el compuesto problema pero con las concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 µg/mL.

Al terminar se debe de proteger de la luz cubriendo la placa con aluminio y se mantienen en agitación constante por 30 min exactos a 37°C. Después de este tiempo se leen las absorbancias en un lector de Elisa a 517 nm.

Tabla 8. Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.

Stock (μL)	MeOH (μL)	[Final Extracto (μg/μL)]
0	1000	0
4	996	1
40	960	10
80	920	20
120	880	30
160	840	40
200	800	50
240	760	60
280	720	70
320	680	80
360	640	90
400	600	100

Para los resultados se deben obtener los porcentajes de reducción de cada concentración evaluada. Para ello se sigue la siguiente fórmula:

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

Donde:

C= Absorbancia del control positivo.

E= Absorbancia de la muestra a evaluar (concentraciones del extracto metanólico con solución DPPH).

Una vez obtenidos los porcentajes de reducción de cada concentración, se grafican. De esa gráfica se determina el modelo estadístico más conveniente a utilizar, de este se despejará X para obtener su valor a una concentración de 50, obteniéndose la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀).

VIII. Caracterización Fitoquímica por métodos colorimétricos de los Extractos.

(Domínguez, 1979).

Los extractos se analizaron mediante las pruebas de presencia y/o ausencia de los grupos de metabolitos secundarios ordenados en la tabla 9:

Tabla 9. Pruebas cualitativas de los principales grupos de metabolitos secundarios con su respectivo reactivo y apariencia positiva.

Grupo	Reactivo	Apariencia positivo
Alcaloides	Mayer	Precipitado lechoso
Saponinas	Agitación	Produce espuma
Taninos	Gelatina al 1%	Precipitados: azul negruzco (T. hidrolizables) y pardo verdoso (T. condensados)
Esteroides y triterpenos	Lieberman-Buchard	Color azul o verde: esteroides. Rojo, violeta/morado: triterpenos
Cumarinas	NaOH	Coloración amarilla que al agregar HCl al 10% desaparece
Fenoles	Cloruro férrico	Color azul-verde
Glicósidos	Molish	Anillo morado

Toxicidad General.

(McLaughlin, 1991; McLaughlin y Rouges, 1998).

Esta técnica se realiza para determinar la toxicidad de, en este caso, el extracto metanólico, de esta forma se puede saber su Concentración Letal media (CL₅₀). Esto con el fin de saber si el extracto puede causar algún daño letal a un organismo simple como lo es la larva de la *Artemia salina*, además de que este modelo es de los primeros para establecer la dosis a la cual un compuesto tiene un efecto tóxico.

Se prepara una solución con 2 mg del extracto metanólico en 2 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Las concentraciones evaluadas fueron de 10, 100 y 1000 µg/mL en 10 mL de agua de mar (38 gr de NaCl por litro de agua), posteriormente se agregan 10 larvas de *A. salina* para cada concentración y cada una se realiza por triplicado.

Como control negativo se utiliza DMSO a las mismas concentraciones que las del extracto a evaluar y como control positivo se utiliza ácido gálico. También se usa un grupo testigo donde no se agrega nada al agua de mar donde están las larvas.

Los viales se deben mantener iluminados con luz blanca por 24 horas con una temperatura de 23-25°C.

Para establecer los resultados se deben de contar las larvas sobrevivientes en los viales de cada concentración. El criterio para determinar si sobrevivió es que deben de moverse igual a aquellas larvas depositadas en el grupo testigo.

La CL₅₀ se determinará sacando el porcentaje del promedio de larvas vivas para cada concentración y se graficarán a través de un análisis de regresión lineal.

Para determinar el grado de toxicidad del extracto se sigue la escala establecida por Jorge y Pino en el 2010.

LITERATURA CONSULTADA.

- Aguilar, A., Argueta, A. y Cano, L. (1994) *Flora medicinal indígena de México*. Tomo I. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México, D. F. México. 450 pp.
- Aiyegoro, O. A. y Okoh, A. (2009) *Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of Helychrysum pedunculatum*. International Journal Molecular Science 10: 4990-5001.
- Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. (2009) *Metabolismo secundario de las plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.
- Avello, M. y Suwalsky, M. (2006) *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. Atenea 494. 2: 161-172.
- Aveñanos, M. (1997) *Introducción a la Química Farmacéutica*. 2ª edición. Elsevier. Madrid, España. 337 p.
- Avila, J.G. (1996). *Actividad anti-Vibrio Cholerae de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha*. Tesis de maestría. FES- Cuautitlán. UNAM. México. 234 p.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México. *Flora Medicinal Popoloca De San Marcos Tlacoyalco Y San Juan Atzingo, Puebla*. (2009). Consultada en: 2016-01-29
Disponibile en:
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=Lippia%20oaxacana%20Robinson%20et%20Greenm.&po=popoloca&id=6184&clave_region=21
- Butler, M. S. (2005) *Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials*. Natural Product Reports. 22: 162-195.
- Cowan, M. (1999) *Plants products as Antimicrobial Agents*. Clinical Microbiology Review. American Society for Microbiology. 12(4): 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. (2000) *Natural Products (Secondary Metabolites)*. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. (24): 1250-1318.

- Dávila, P., Del Coro, A. M., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J., L., Casas, A., Lira, R. (2002) *Biological diversity un the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico*. Kluwer Academic Publishers. Biodiversity and Conservation 11: 421-442.
- Domínguez, M.A., (2003). *Estudio estructural y actividad antimicrobiana de los metabolitos presentes en Rhoeo discolor L. Her Hance*. Tesis de Doctorado en el área de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. 144 p.
- Filho, J. G. S., Melo, J. G. S., Saraiva, A. M., Golcaves, A. M., Psiottano, M. N. C. y Xavier, H. S. (2006) *Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown*. Revista Brasileña de Farmacognosia. 16(4): 506-509.
- García-Pérez, E., Castro-Álvarez, F. F., Gutiérrez-Urbe, J. A., García-Lara, S. (2012) *Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3(2): 339-353.
- González, E. R. (2002) *Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso*. Revista Cubana Estomatol. 39(2): 139-156.
- Gregori, V. B. S. (2005) *Estructura y actividad de los Antifúngicos*. Revista Cubana Farmacéutica. 39(2):1-15.
- Hartl, M. y Humpf, H. U. (2000) *Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (Artemia salina) bioassay*. Food and Chemical Toxicology 38: 1097-1102.
- Henao, J., Muñoz, L. J., Ríos, E. V., Padilla, L. y Giraldo, G., G. (2009) *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta Lippia origanoides h. b. k. Cultivada en el departamento del Quindío*. Revista de Investigación del Quindío. Armenia, Colombia. (19): 159-164.
- Hernández, T. Canales, M. Ávila, J. G. Durán, A. Caballero, J. Romo de Vivar, A. Lira, R. (2003) *Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used intraditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México)*. Journal of Ethnopharmacology. 88: 181-188.
- Hernández, T., Canales, M., Caballero, J., Durán, Á., Lira, R. (2005)

Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. Red de Revistas Científicas de América Latina: El Caribe, España y Portugal. 30(9): 529-535.

- Hernández, T. Canales, M. García, A. M. Durán, A. Meráz, S. Dávila, P. Ávila, G. (2008) *Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: Lantana achyranthifolia and Lippia graveolens of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México).* Boletín Latinoamericano del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 7(4): 203-207.
- Hernández, T. García-Bores, A. M. Serrano, R. Ávila, G. Dávila, P. Cervantes, H. Peñalosa, I. Flores-Ortiz, C. M. Lira, R. (2015) *Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del valle de Tehuacán-Cuicatlán.* Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 18(2): 116-121.
- Instituto de Biología. "*Lippia oaxacana* - IBUNAM:MEXU:OAX1127210". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-08-12. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2016-3-13. Disponible en:
<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX1127210>
- Koneman, E., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. (1996). *Diagnóstico microbiológico.* Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 909 p.
- Lawrence, B. M., Hogg, J. W., Terhune, S. J., Pichitakul, N. (1972) *Essential oils and their constituent. IX Oils of Ocimum tenuiflorum and Ocimum basilicum from Thailand.* Journal of Medicinally Active Plants. 2: 33-41.
- Macarulla, J. M. y Goñi, F. M. (1994) *Bioquímica Humana. Curso básico.* 2ª edición, Editorial Reverté. Barcelona, Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México. 161-163.
- Márquez, L. D. y Suárez, L. A. (2008) *El uso de los taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes.* Revista de Medicina Veterinaria, 16: 89-95.
- McLaughlin, J. L. (1991) *Crown Gall Tumor son Potato Disc and Brine*

- Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation*. In: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. *Methods in plants Biochemistry Assays for Bioactivity*. Academic Press, USA. 6: 1-32.
- McLaughlin, J. L. y Rouges, L. L. (1998) *The use of biological assays to evaluate botanicals*. *Drug Information Journal*. 32: 513-524.
 - Medina-López, L. A., Araya-Barrantes, J. J., Tamayo-Castillo, G. y Romero, R. M. (2011) *Comparación de metodologías de extracción para Limoneno y Carvona en Lippia alba usando cromatografía de gases*. *Ciencia y Tecnología*. 27(1 y 2): 1-13.
 - Newman, D. J. y Cragg G. M. (2007) *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. *Journal Natural Products*. 70: 461-77.
 - OMS. (2001) *Estrategia Mundial de la OMS para Contener la Resistencia a los Antimicrobianos*. Organización Mundial de la Salud. Suiza. Disponible en:
http://www.antibioticos.msssi.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
 - OMS. (2002) *Medicina Tradicional-Necesidades Crecientes y Potencial*. Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2295s/s2295s.pdf>
 - Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P. (2007) *Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of Cordia gilletti De Wild (Boraginaceae)*. *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 476-481.
 - Ortíz-Pulido, R., Díaz, S. A., Valle-Díaz, O. I. y Fisher, A. D. (2012) *Hummingbirds and the plants they visit in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve, Mexico*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83: 152-163.
 - Osorio, D. E. J. (2009) *Aspectos básicos de farmacognosia*. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Colombia. 15-20.
 - Otero, M. e Hidalgo, L. (2004) *Condensed tannins in temperate forages species: effects on the productivity of ruminants infected with internal parasites*. *Livestock Research for Rural Development* 16(2): 18-36.

- Pino, P. O. y Jorge, L. F. (2010) *Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales*. Revista de Protección Vegetal 22(1): 34-43.
- Pino, N. y Valois, H. (2004) *Ethnobotanical of four black communities of municipality of Quibdó, Choco-Colombia*. Lyona Journal of Ecology. Application 7(2): 61-69.
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (1997) *Fungi and Food Spoilage*. Editorial Springer-Science-Business Media, B. V. Sydney, Australia. 40 p.
- Pontón, J. (2008) *La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina*. Revista Iberoamericana de Micología. 25: 78-82.
- Porras-Loaiza, A. P. y López-Malo, A. (2009) *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos. 3: 121-134.
- Reyna, C. A. O. (2015) *Estudio de las propiedades antioxidantes de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 53 p.
- Ruiz, C. Tunarosa, F. Martínez, J. Stashenko, E. (2007) *Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de Lippia origanoides H. B. K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción*. Scientia et Technica. 13(33): 325-328.
- Sansón, R. G. (2012) *Estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica de la planta Piqueria trinervia Cav.* Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente-Bousquets, J., Halffter, G., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S., de la Maza, J. (2009) *Capital Natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectiva de sustentabilidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. México. 100 p.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Natural de Áreas Naturales Protegidas. (2013) *Programa de manejo Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán*. SEMARNAT. CONANP. Tehuacán-Cuicatlán Reserva de la Biósfera. México. 329 p.

- Sena-Filho, J. G., Melo, J. G. S., Saraiva, A. M., Gonçalves, A. M., Caetano-Psiottano, M. N., Xavier, H. S. (2006) *Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown*. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 16(4): 506-509.
- Sepúlveda-Jiménez, G. (2004) *La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas*. Revista Mexicana de Fitopatología. 21(3): 355-363.
- Singleton, L. V., Orthofer, R. y Lamuela, R. M. (1999) *Analysis of total phenols and oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Coicalteu reagent*. Methods in Enzymology. 299: 152-178.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E. y Martínez, J. R. (2003) *Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae*. Revista Académica Colombiana Científica. 27(105): 579-598.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Durán, D. C., Córdoba, Y., Caballero, D. (2014) *Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género Lippia (Verbenaceae) cultivadas en Colombia*. Revista Académica Colombiana de Ciencias. 38: 89-109.
- Toscano, S. C. (2015) *Efecto del extracto metanólico de Lippia graveolens en el desarrollo de carcinomas cutáneos en ratones SKH-1*. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. México. 59 p.
- Valiente-Banuet, A., Solís, L., Dávila, P., Coro, A. M., Silva, P. C., Ortega-Ramírez, J., Treviño, C. J., Rangel-Landa, S., Casas, A. (2009) *Guía de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Margen Rojo, S. C. México. 209 p.
- Vasek, O. M, Cabrera, R., Coronel, G. J., De Giori, G. S. y Fusco, A. J. V. (2004) *Análisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de corrientes (Argentina)*. FACENA. 20: 13-22.
- Vera, J. R. Pastrana, P. F. Fernández, K. Viña, A. (2007) *Actividad antimicrobiana in vitro de volátiles y no volátiles de Lippia alba y extractos orgánicos y acuoso de Justicia pectoralis cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima*. Scientia et Technica. 33: 345-348.

- Viljoen, A. M., Subramoney, S., van Vuuren, S. F., Baser, K. H. C. y Demirci, B. (2004) *The composition, geographical variation and antimicrobial activity of Lippia javanica (Verbenaceae) leaf essential oils*. Journal of Ethnopharmacology. 96: 271-277.
- Villaseñor, J. L. (2004) *Los géneros de plantas vasculares de la flora de México*. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 75(2): 105-135.
- Waghorn, G. (2007) *Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production. Progress and challenges*. Animal Feeds Science and Technology. En prensa. 24 p.
- Wang, H. y Bun, T. N. (2002) *Isolation of an Antifungal Thaumatin-like protein from kiwin fruits*. Phytochemistry. 61: 1-6.