



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y
PROTOTIPOS**

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LAS FLORES DE
Prosopis laevigata (Humb. & Bonpl. Ex Willd)**

M.C. Jhonst

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O**

**PRESENTA:
URIEL NAVA SOLIS**

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Ma. Margarita Canales Martínez**





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

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

Fue dirigido por la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dr.a María Margarita Canales Martínez.

M. en C. Judith Salas Oropeza.

M. en C. Ana Bertha Hernández Hernández.

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

Financiamiento: UNAM-PAPIIT IN212317

Uriel Nava Solis recibió la beca

Licenciatura/Conclusión de estudios

del proyecto UNAM-PAPIIT IN212317

A partir de la sabiduría, la comprensión.

A partir de la comprensión, la compasión.

A partir de la compasión, el amor.

Richard Wagner.

*Nunca se alcanza la verdad total,
ni nunca se está totalmente alejado
de ella.*

Aristóteles

*Hay una fuerza motriz
más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica:
la voluntad.*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Doctora Margarita Canales, quien me vio desde el inicio de mi formación como biólogo. Las palabras no podrían expresar mi gratitud hacia usted por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo en el laboratorio de Farmacognosia. Agradezco infinitamente todas sus enseñanzas, todos sus consejos y todos sus regaños, que, impartidos como una madre, siempre han estado encaminados a hacer de todos nosotros mejores investigadores, alumnos y seres humanos.

Al Doctor Marco Aurelio Rodríguez por la ayuda brindada en la realización de este trabajo, por sus consejos, aportaciones y correcciones, así como por el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

Al Doctor César Mateo Flores por interesarse en este proyecto y tomarse el tiempo de leer, corregir y engrandecer este trabajo.

A la Maestra en Ciencias Ana Hernández, invaluable guía y ejemplo a seguir durante mi estancia en el Laboratorio de Farmacognosia, quien, con la calidez y entusiasmo que siempre la han distinguido, fue una pieza fundamental para la concreción de este proyecto.

A la Maestra en Ciencias Judith Salas, guía, compañera y amiga, quien estuvo desde el comienzo de este proyecto y que en muchas ocasiones tuvo el consejo pertinente, la corrección puntual y la disponibilidad necesaria para que este trabajo saliera adelante.

Deseo realizar un agradecimiento especial al equipo del laboratorio de Farmacognosia, quienes fueron un apoyo profesional y filial durante la elaboración de este proyecto. Les agradezco a Rebeca, Karla, Hatziri, Michael, Eslie, Mara, José Manuel, Rodrigo, Jenny y José por su incalculable ayuda dentro de cada uno de las técnicas, sus explicaciones, los gratos momentos, las risas y los consejos, mostrándome que un equipo de trabajo no solo es un grupo de personas que

laboran juntas, sino que se convierte, con el tiempo, en una verdadera familia donde uno puede encontrar el apoyo que necesita en sus peores momentos.

Otro agradecimiento especial deseo hacerlo al equipo del laboratorio de Inmunología, por su apoyo y consejo en cada paso de este proyecto, involucrándose desinteresadamente en cada etapa de este proyecto. Les agradezco a Óscar, Nelly, Alonso, Mario, Lesslie, Gustavo, Rubén, Judith, Miguel, Fanny, Pilar, Daniela, Octavio y Alma por su apoyo y muestras de compañerismo desde el primer momento en que estuve en el equipo de trabajo.

Por último, pero no menos importante, quiero hacer mención especial a la Bióloga Alicia Teresa de Jesús Castro Trejo por haber comenzado con el estudio de *Prosopis laevigata* iniciando prácticamente desde cero, y que, gracias a su titánica labor, descubrimos las cualidades de las flores de esta maravillosa planta. Gracias por ser pionera en este trabajo y por haber intervenido, aun desde la lejanía, para que este documento llegara a su feliz término.

DEDICATORIAS

A mi madre, Isabel Solis, quien fue mi primera guía y mi primera maestra; a ella, quien con el ejemplo me enseñó en el gusto por la ciencia y el conocimiento desde mi más tierna infancia, mostrándome que lo más importante en la vida es sentir pasión por lo que se realiza, y nunca detenerse ante nada, “sacando la casta” en todo momento. Este no es solo un triunfo mío, sino también tuyo. Te quiero.

A mi abuela, Clara Crooke, quien, con todo su cariño e infinita ternura, siempre ha sido el apoyo para todos mis proyectos, siendo uno de los más grandes ejemplos a seguir por su inconmensurable humanidad y su capacidad de mostrarme que no hay obstáculo que valga para lograr lo que uno se propone. Gracias Abue.

A mi hermana, Guadalupe Nava, que, con su ejemplo, y pese a su edad, siempre me ha mostrado la necesidad de ser terco cuando uno realmente desea alcanzar sus sueños.

A mi tía Marta Ortega, poseedora de talentos incalculables, solo comparables a su enorme corazón. Su ánimo, consejos y su sentido de la familia fueron indispensables para que yo llegara hasta este momento, siendo un ejemplo constante de entrega y pasión por la profesión que uno escoge.

A Arturo Romero Lora, quien me enseñó todo lo necesario para ser un hombre de bien; con su ejemplo y constancia, me obligó a forjar carácter y que siempre me alentó a ser cada día mejor.

A la Maestra Ana Hernández, que más que guía, fue una amiga invaluable y un ejemplo a seguir durante mi estancia en el laboratorio de Farmacognosia, dándome el empuje necesario para continuar cuando ya deseaba aventar la toalla.

A la Maestra Karla Martínez, que me vio en mis primeros estadios dentro de la carrera y que, desde su clase y en el laboratorio, me ayudó a definir mi área de investigación.

A la Maestra Rebeca Rivera, amiga y guía, quien siempre tuvo la palabra amable o el consejo acertado cuando ya no encontraba solución a las incógnitas más difíciles de este proyecto.

A la Profesora Rosario Fernández, mujer entusiasta e incansable, cuya energía fue una gran inspiración y cuya entrega a su trabajo es ejemplo del amor que se debe tener a la actividad que uno ejerza.

Al Profesor Juan Mario Macías, quien, a manera del Virgilio de Dante, me guío por el tortuoso camino que lleva al paraíso de la Biología.

A la Maestra Rebeca Zárate, mi tutora en la Escuela Normal Superior de México, madre académica exigente y bondadosa, que reafirmó mi pasión por las ciencias cuando me sentía perdido.

A la Doctora Odete Serna, docente incansable y fuente de conocimiento magisterial y botánico, quien despertó en mi la curiosidad por aprender más acerca de las plantas y sus procesos biológicos.

Al Profesor Emilio Rodríguez, hombre de insuperable entusiasmo, que siempre me insistió en buscar la respuesta más creativa en el tablero y en la vida.

A la Maestra Leticia Villanueva, joven ejemplo a seguir, quien me ha enseñado, desde el primer momento en que nos conocimos, a luchar por lo que uno quiere sin importar las circunstancias que nos rodeen.

A la Maestra Thayde Rivera, imagen clara de los resultados de la perseverancia y la pasión, quien, tanto con su presencia como su ausencia, fue un apoyo en los momentos más peliagudos de esta investigación.

A Rodrigo Arredondo, que, con el tiempo, se convirtió en algo más que un amigo, siendo un hermano y gran apoyo no sólo en el trabajo, sino en todo, y que, durante este trabajo, me recordó que la tenacidad y la diligencia son piezas clave para el logro de todo objetivo.

A José Bernal, colega, compañero y amigo, quien siempre tuvo la mejor actitud en los momentos de trabajo, enseñándome, con su ejemplo, que la voluntad, la buena actitud y el valor son las armas más poderosas con las que uno cuenta cuando se tienen dificultades y que con ellas, uno es capaz de salir adelante a pesar de todo.

A Natalie Jiménez, amiga incondicional y cómplice durante toda la carrera, con quien aprendí la enorme necesidad de la verificación constante y la necesidad de imaginación para lograr todo lo que uno se proponga en su vida.

A Linet Reyes, mujer de coraje sólo comparable con su sentido de humanidad, quien desde el primer semestre fue amiga, compañera, consejera, cómplice y lectora de mis locuras.

A Cecilia Castillo, amiga que, como una chispa de genialidad en la oscuridad, siempre estuvo ahí para mostrarme lo que no había visto, haciéndome comprender que el éxito se compone de una parte de genialidad, una de imaginación y dos de esfuerzo.

A Amauri Rodríguez, quien, con su amistad intermitente pero segura, fue un apoyo durante toda la carrera y que me recordó la importancia de seguir las metas que uno se fija, pase lo que pase.

A Diana Blanquet, invaluable amiga que, siempre, y desde la distancia, fungió como un faro cuando llegué a perder el rumbo y fue una de las voces más fuertes al apoyarme en este loco sueño de ser biólogo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	8
PROBLEMA.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	9
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
MATERIAL Y MÉTODO.....	11
a) Colecta del material.....	11
- Obtención de extractos metanólicos.....	11
b) Pruebas biológicas.....	11
1. Actividad antibacteriana.....	11
-Evaluación cualitativa.....	11
-Evaluación cuantitativa.....	11
- Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	12
2. Actividad antifúngica.....	12
2.1 Evaluación cualitativa.....	12
- Hongos levaduriformes.....	12

- Hongos filamentosos.....	12
2.2 Evaluación cuantitativa.....	12
3. Toxicidad general.....	12
c) Pruebas químicas.....	13
1. Actividad antioxidante de los extractos.....	13
2. Cuantificación de Fenoles Totales.....	13
3. Cuantificación de Flavonoides Totales.....	13
4. Cuantificación de Alcaloides Totales.....	14
5. Cuantificación de xantofilas totales por espectrometría.....	14
6. Perfil de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	14
7. Caracterización química de los extractos.....	14
RESULTADOS.....	15
a) Colecta del material.....	15
- Obtención de extractos metanólicos.....	15
b) Pruebas biológicas.....	15
2. Actividad antibacteriana.....	15
-Evaluación cualitativa.....	15
-Evaluación cuantitativa.....	19
-Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	21
2. Actividad antifúngica.....	24
- Evaluación cualitativa sobre sobre hongos levaduriformes.....	24
- Evaluación cuantitativa del efecto de los extractos en hongos levaduriformes.....	26

- Evaluación cuantitativa de hongos filamentosos.....	28
-Evaluación cuantitativa del efecto de los extractos en hongos filamentosos.....	29
3. Toxicidad general.....	31
c) Pruebas químicas.....	34
1. Actividad antioxidante de los extractos.....	34
2. Pruebas cualitativas.....	34
3. Cuantificación de Fenoles Totales, Flavonoides totales y Alcaloides Totales.....	35
4. Cuantificación de xantofilas totales por espectrometría.....	36
5. Perfil de xantofilas por cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	36
6. Caracterización química de los extractos.....	39
7. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	39
8. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	45
9. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).....	49
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIÓN.....	63
APÉNDICES.....	64

Apéndice 1 Descripción botánica de <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. Et Bonpl. Ex Wild) M.C Johnst.....	64
Apéndice 2 Zona de colecta.....	67
Apéndice 3 Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.....	70
Apéndice 4 Microtécnica de dilución en caldo.....	74
Apéndice 5 Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	76
Apéndice 6 Prueba para la obtención de CF ₅₀ en Hongos filamentosos.....	78
Apéndice 7 Método de toxicidad general.....	85
Apéndice 8 Conteo de fenoles totales (CFT).....	87
Apéndice 9 Contenido de flavonoides totales Método Dowd.....	90
Apéndice 10 Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•).....	93
Apéndice 11 Detección cualitativa de alcaloides.....	97
Apéndice 12 Cuantificación de Alcaloides.....	98
Apéndice 13 Extracción de alcaloides.....	101
Apéndice 14 Cuantificación de xantofilas por espectrometría.....	102
Apéndice 15 Cuantificación de la proporción de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	104
Apéndice 16 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC- MS).....	106
Apéndice 17 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	108

Apéndice 18 Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).....	110
Apéndice 19 Antibiógramas.....	112
BIBLIOGRAFÍA.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de halos de inhibición Bacteriana.....	17
Figura 2. Comparación cualitativa de los extractos sobre bacterias por tipo bacteriano.....	18
Figura 3. Halos de inhibición bacteriana con el extracto de la colecta de febrero....	19
Figura 4. Halos de inhibición bacteriana con el extracto de la colecta de marzo....	19
Figura 5. Actividad del extracto metanólico de la colecta de febrero sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 6. Actividad del extracto metanólico de marzo sobre la curva de crecimiento bacteriano en <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 7. Actividad del extracto metanólico de la colecta de febrero sobre la curva de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i>	23
Figura 8. Actividad del extracto metanólico de la colecta de marzo sobre la curva de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i>	23
Figura 9. Gráfico de inhibición de hongos levaduriformes.....	25
Figura 10. Ejemplo de halos de inhibición de crecimiento de hongos levaduriformes obtenidos con el extracto de la colecta de febrero.....	26
Figura 11. Ejemplo de halos de inhibición de crecimiento de hongos levaduriformes obtenidos con el extracto de la colecta de marzo.....	26

Figura 12. Evaluación cuantitativa de la inhibición del extracto de la colecta de marzo en hongos levaduriformes.....	27
Figura 13. Ejemplo de inhibición del crecimiento radial del micelio de hongos filamentosos con el extracto de la colecta de febrero.....	28
Figura 14. Ejemplo de inhibición del crecimiento radial del micelio de hongos filamentosos con el extracto de la colecta de marzo.....	29
Figura 15 Tratamientos utilizados para la determinación de la toxicidad del extracto de la colecta de marzo.....	29
Figura 16. Ensayo de letalidad del extracto de la colecta de febrero.....	32
Figura 17. Ensayo de letalidad del extracto de la colecta de marzo.....	33
Figura 18. Cromatograma para la identificación de pigmentos del extracto de la colecta de febrero.....	37
Figura 19. Cromatograma del análisis HPLC de pigmentos de <i>P. laevigata</i> realizado con la muestra de la colecta de marzo.....	38
Figura 20. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico de la colecta de febrero.....	40
Figura 21. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico de la colecta de marzo.....	42
Figura 22. Cromatograma del extracto de la colecta de febrero.....	45
Figura 23. Cromatograma de la fracción metanólica del extracto de marzo.....	47
Figura 24. Cromatograma de la fracción obtenida con diclorometano del extracto de marzo.....	48
Figura 25. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) del extracto de la colecta de febrero.....	50

Figura 26. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) del extracto de la colecta de marzo.....	52
---	----

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Halos de inhibición bacteriana.....	15
Cuadro 2. MIC y CBM de ambos extractos.....	19
Cuadro 3. Halos de inhibición en levaduras.....	24
Cuadro 4. CFM Y CF ₅₀ de los extractos sobre levaduras.....	27
Cuadro 5. Inhibición del crecimiento radial de hongos filamentosos.....	28
Cuadro 6. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial sobre hongos filamentosos del extracto de febrero.....	30
Cuadro 7. Porcentaje de evaluación cualitativa sobre hongos filamentosos del extracto de marzo.....	30
Cuadro 8. CF ₅₀ Calculadas para ambos extractos sobre Hongos filamentosos.....	31
Cuadro 9. Toxicidad de los extractos.....	32
Cuadro 10. Actividad antioxidante de los extractos.....	34
Cuadro 11. Resultados de las pruebas colorimétricas aplicadas a los extractos.....	35
Cuadro 12. Cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides.....	36
Cuadro 13. Cuantificación de xantofilas totales.....	36
Cuadro 14. Espectro UV con el pico máximo de absorción de pigmentos de <i>P. laevigata</i> para la colecta de febrero.....	38
Cuadro 15. Espectro UV con el pico máximo de absorción de pigmentos de <i>P. laevigata</i> para la colecta de marzo.....	39

Cuadro 16. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto de la colecta de febrero.....	40
Cuadro 17. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto de la colecta de marzo.....	43
Cuadro 18. Compuestos determinados por CG-EM en el extracto de la colecta de febrero.....	46
Cuadro 19. Compuestos identificados en la fracción metanólica de la muestra de marzo por GC-MS.....	47
Cuadro 20. Compuestos identificados en la fracción de diclorometano de la muestra de marzo por GC-MS.....	49
Cuadro 21. Análisis del extracto de la colecta de febrero en HPLC-MS.....	51
Cuadro 22 Análisis del extracto metanólico de <i>P. laevigata</i> en HPLC-MS.....	53

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTICROBIANA DE LAS FLORES DE *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd) M.C. Jhonst

Resumen

Se evaluaron las propiedades antimicrobianas de las flores de mezquite obtenidas en dos condiciones ambientales distintas: el estiaje invernal (colectadas en febrero) y lluvias tempranas (colectadas en marzo). Se obtuvo actividad inhibitoria de ambos extractos sobre diferentes bacterias Gram positivas y negativas, obteniendo, con el primer extracto halos de hasta 21 mm y con el segundo halos de hasta 26 mm, encontrando una mayor susceptibilidad en cepas de *Staphylococcus aureus* y de *Vibrio cholerae*, identificándose un comportamiento bactericida del primer extracto en ambas cepas y un comportamiento bactericida con *Vibrio cholerae* y uno bacteriostático sobre *Staphylococcus aureus* del segundo. Se obtuvieron halos de inhibición sobre hongos levaduriformes de hasta 20 mm con el primer extracto y de hasta 19 mm con el segundo, hayando mayor inhibición en *Cryptococcus neoformans*, y determinando a *Candida tropicalis* como la levadura con mayor sensibilidad (CFM= 0.625 mg/mL y CFM= 10 mg/mL respectivamente). Se encontró sensibilidad sobre cepas del género *Fusarium* y *Trichophyton* con ambos extractos. Se determinó una mayor toxicidad en el extracto de febrero, con un 96% de mortalidad sobre *Artemia salina* con una concentración de 10 ppm. Se obtuvo una baja capacidad antioxidante para ambos extractos ($CA_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Se cuantificó una mayor concentración de fenoles, flavonoides y alcaloides totales en el extracto de marzo, y una mayor concentración de xantófilas en el extracto de febrero. La caracterización química de ambos extractos arrojó la presencia de ácido palmítico y linoleico, y se detectaron Vainillina, Acacetina, Crisina y Ácido cafeico en el primer extracto y Pinocebrina, Apigenina, Naringenina, Kaempferol y Quercetina en el segundo. Con estos resultados se concluyó que la flor de *Prosopis laevigata* presenta actividad inhibitoria sobre diferentes cepas microbianas, la cual varía conforme a las condiciones ambientales de colecta.

Palabras clave: Flor de mezquite, *Prosopis laevigata*, Actividad antibacteriana, Actividad antifúngica.

Introducción

En el mundo existen cientos de géneros de especies microbianas que resultan perjudiciales para el ser humano, la mayoría de ellos pertenecientes a los reinos Monera y Fungi que se distinguen por su alta capacidad adaptativa a las condiciones adversas del medio (Pérez, 2000). La resistencia y la capacidad de adaptación de estos organismos, por tanto, supone una seria dificultad en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Bezerra, 2014).

El siglo XX se caracterizó por la obtención y utilización de diferentes productos que permitían acabar de forma efectiva con las principales infecciones microbianas (Muñoz et al., 2004). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos medicamentos ha traído no sólo problemas serios a la salud, como la aparición de reacciones alérgicas, toxicidad y resistencia, sino además, un efecto de aceleración en la tasa de mutaciones en las especies microbianas, debido a que se encuentran sometidas a una constante presión de selección (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003). Estos fenómenos han tenido como consecuencia la pérdida de efectividad de los antibióticos alopáticos y con ello, la búsqueda de alternativas seguras y eficaces.

Un área de estudio que ha tenido un auge considerable en los últimos años es la búsqueda de sustancias producidas de forma natural para el combate de infecciones, siendo los organismos vegetales los que más interés han despertado debido a que éstos producen una gran cantidad de compuestos que utilizan para su defensa contra los ataques de organismos patógenos (Bermúdez et al., 2005). Para esto, un punto de partida ha sido la medicina tradicional, ya que el conocimiento que ofrece, a pesar de ser empírico, es una excelente guía en la búsqueda de compuestos de interés.

EL uso de plantas para el tratamiento de enfermedades no es nuevo. La relación del hombre con los organismos vegetales es tan antigua como la misma humanidad (Cortés, 2005), y esto se debe a que el hombre siempre ha encontrado en éstos una amplia gama de beneficios, entre los que se destacan el alimenticio y el medicinal (Cronquist, 1969), sin dejar de lado los recursos para construcción, maderables,

combustibles, instrumentos de trabajo, forrajes, estéticos, etcétera (Sarukhán, 1995).

Cuando se habla del uso medicinal de las plantas, se hace referencia a un enorme sistema tradicional de tratamiento de todo tipo de enfermedades, desde infecciosas hasta fisiológicas, pasando por tratamiento de traumatismos y padecimientos nerviosos (Aguilar et al., 1994). Por esta razón, los productos naturales tales como los extractos vegetales y los compuestos purificados, son fuente de oportunidades ilimitadas para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos, debido a la amplia diversidad química que presentan las plantas (Sánchez, 2012).

México se caracteriza, debido a su alta diversidad biológica, por tener una gran variedad de tratamientos de origen tradicional. En cada estado de la república existen cientos, sino es que miles de recetas que tienen como base el uso de la flora y fauna para tratar una gran cantidad de males, siendo los más socorridos aquellos que están relacionados con infecciones, ya sean fúngicas o bacterianas. Una de las regiones que tiene un interés especial por su alta diversidad biocultural es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, que se asienta en el sureste del estado de Puebla y el noreste de Oaxaca y es considerado, una de las zonas de mayor diversidad vegetal y cultural de México, pues en un área relativamente pequeña (10000 Km²) coexisten cerca de 3000 especies de plantas (casi 13,9% de ellas endémicas; Dávila et al., 2002). Este valle es considerado como un centro de megadiversidad y endemismo a nivel mundial por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y recientemente ha sido decretado como una Reserva de la Biósfera (Hernández et al., 2005).

En contraste con la amplia información botánica del área, el conocimiento de las relaciones que tienen los habitantes con los vegetales se encuentra aún en proceso de construcción, teniendo como antecedentes recientes, por ejemplo, a Casas et al. (2001), que identificaron un total de 810 especies de plantas vasculares utilizadas por los habitantes y de las cuales, 159 tienen un marcado uso para el tratamiento de diversas afecciones; Paredes (2001) identificó 280 especies útiles pertenecientes a 203 géneros y 76 familias de plantas vasculares, de las cuales 90

resultaron medicinales en el Valle de Zapotitlán de Salinas; Rosas (2003) identificó en la comunidad de San Rafael Coxcatlán un total de 366 especies pertenecientes a 87 familias botánicas, y que, para la comunidad, se agrupan en más de 19 categorías, destacando el uso para la alimentación (muchos de estos recursos son utilizados incluso en el comercio), la protección y fomento de la salud y como combustibles; por otro lado, Canales et al., en 2005, reportó en un estudio etnobotánico 46 especies pertenecientes a 27 familias utilizadas en la misma comunidad con uso terapéutico en 13 diferentes grupos de padecimientos, entre los que destacan diferentes padecimientos de origen microbiano como enfermedades gastrointestinales, respiratorias, urinarias y ginecológicas.

No obstante la utilidad de esos estudios, aún se requiere información sobre las plantas utilizadas en esa región y especialmente en lo que se refiere a la importancia relativa de las especies en la zona, así como a la identificación de patrones en cuanto a la distribución del conocimiento. La recopilación, análisis y validación de esta información para la zona, tiene relevancia desde el punto de vista de la etnobotánica aplicada, pues podrá contribuir de manera significativa en la definición de estrategias para el aprovechamiento y manejo de sus recursos, tareas que son prioritarias en una reserva de la Biósfera como lo es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Lira et al., 2001).

Un género que ha sido utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades es el género *Prosopis* que en nuestro país tiene como representantes a *P. glandulosa*, *P. velutina*, *P. strombulifera*, *P. pubescens*, *P. juliflora* y *P. laevigata*, las cuales son denominadas de forma genérica como *mezquite* (Folliot y Thames, 1983). Los mezquites se distribuyen en las zonas áridas y semi-áridas del país, abarcando el centro-sur. Abundan especialmente en estados como Jalisco, Zacatecas y Aguascalientes, donde son considerados el árbol oficial. Su distribución se extiende por todo el norte del país y abarca hasta el sur de EE. UU., en Texas, el sudoeste de Kansas, y del sudeste de California al sudoeste de Utah y el límite sur del desierto de Sonora (Rzedowski, 1988).

Al hablar de la importancia ecológica de los mezquites, se tiene reportado que son mejoradores del suelo ya que establecen asociaciones con bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium*), las cuales incrementan la fertilidad. Además, poseen raíces profundas que evitan la pérdida de suelo, disminuyendo así la erosión. De esta forma, las plantas de *Prosopis sp.* modifican el microambiente ya que disminuyen la pérdida de agua e incrementan la materia orgánica del suelo, favoreciendo la germinación de las semillas, la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas (Frías-Hernández et al., 2000).

Otro aspecto ecológico importante a considerar, es el hecho de que establecen interacciones con otros organismos que habitan en la comunidad (Roldán, 2004), reconociéndose que sus flores y frutos proveen alimento a algunos animales como insectos (particularmente himenópteros) y mamíferos (principalmente a los ganados equino, caprino y ovino) (Frías-Hernández et al., 2000). Adicionalmente, su copa puede proporcionar sitios de refugio y reproducción para organismos diversos, además de ser un organismo indicador de mantos freáticos (Rodríguez et al., 2014).

En relación con el aspecto económico, los mezquites tienen gran importancia ya que desde la época prehispánica sus hojas, raíces, yemas y corteza han sido utilizados para diversos fines (Mata, 2009; Flores, 2011), siendo los más comunes la obtención de leña, carbón, goma, materiales de construcción, alimento, forraje, néctar para la apicultura y como planta medicinal (Rodríguez et al., 2014). volviéndose de interés en el sector ganadero y alimentario, ya que se han reportado importantes propiedades nutricionales, además de que el fruto suele ser de alta palatibilidad para el ganado bovino, caprino y bovino (Tabosa et al., 2000).

Prosopis laevigata, es una especie endémica de México (Frías-Hernández et al., 2000) y corresponde al mezquite típico del centro y sur del país (Rzedowski, 1988). En el poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla, el principal uso que se le da es como leña y madera para fabricar diversos artículos (Rosas, 2003).

Por otro lado, se ha reportado el aprovechamiento del género *Prosopis* en la medicina tradicional de diversas regiones de América, destacando su eficiencia en infecciones respiratorias, gastrointestinales y oculares mediante infusiones que son ingeridas por el paciente o utilizadas para realizar lavados en las áreas afectadas (Corzo et al., 2009; Toursarkissian, 1980; Salinas et al., 2009). Para tal fin, se utilizan hojas, trozos de corteza y ramas en las cocciones. Además, se han reportado mieles monoflorales producidas a partir del néctar de las flores de especies de este género con altas capacidades bactericidas (Maidana et al., 2008) y en 2016, Castro reportó que las flores de la especie *Prosopis laevigata* presentan una alta actividad antibacteriana.



Inflorescencia de *Prosopis laevigata*

En este punto, se debe mencionar que la flor es la unidad estructural y funcional que está altamente especializada en la reproducción sexual y es característica de las angiospermas. De forma técnica, se define a este órgano como “Brote de crecimiento limitado, con nudos muy próximos unos de otros, que portan hojas transformadas en piezas florales” (Cruz y Rosas, 2013). Los procesos básicos en los que participa la flor son la polinización, la fecundación y la formación de semillas y frutos maduros.

La flor típica presenta cuatro zonas o *verticilos*, es decir, conjuntos de piezas florales, que son:

- a) Cáliz. Es el verticilo más externo, y se compone de estructuras denominadas *sépalos*, los cuales son hojas modificadas, generalmente de color verde.
- b) Corola. Se denomina así al conjunto total de pétalos, que son hojas modificadas que presentan una coloración generalmente llamativa, diferente a la de los sépalos.
- c) Androceo. Es el conjunto total de estambres y se encarga de la formación de los gametofitos masculinos (granos de polen).

d) Gineceo. Es el verticilo floral en donde se desarrollan los gametofitos femeninos y se compone, de forma general por ovario, estilo y estigma. Sus estructuras tienen la particularidad de favorecer la fecundación por medio de la captura de los granos de polen. (Cruz y Rosas, 2013).

Las flores se pueden encontrar en dos formas básicas: como flores solitarias, o como conjuntos de flores estrechamente unidos. A estos últimos se denominan *Inflorescencia*. En el caso de *Prosopis laevigata*, presenta una inflorescencia de tipo espiga, que se caracteriza por tener flores sésiles o sentadas, las cuales se forman durante un periodo relativamente corto que inicia entre los meses de febrero y marzo y termina entre abril y mayo (Cervantes y Concepción, 2002).

La transición de la fase vegetativa a la reproductiva es un proceso fundamental en el ciclo de vida de una planta, ya que permite su multiplicación. Depende de que la planta llegue a un estadio adecuado para que el florecimiento se produzca en condiciones favorables para la polinización y anticipando que las condiciones ambientales sean las adecuadas para el desarrollo de las semillas (Márquez, 2013). Este proceso implica, por lo tanto, la coordinación entre la percepción de diferentes estímulos ambientales tales como la disponibilidad de agua, la longitud del día, la calidad lumínica y la temperatura ambiental (Gamboa-de Buen et al., 2013 (1)).

De forma general, se puede decir que las plantas de zonas áridas presentan poca respuesta al fotoperiodo, ya que son organismos que están adaptados a resistir altas radiaciones lumínicas, por lo que sus procesos de florecimiento y fructificación dependen especialmente de la disponibilidad de agua o la humedad relativa del ambiente (Gamboa-de Buen et al, 2013 (1)). Otro factor recientemente estudiado es la concentración de CO₂ ambiental y se ha observado que en algunas especies pertenecientes a la familia de las Rubiáceas, las Solanáceas y algunas Leguminosas, especialmente del grupo de las Fabales, puede adelantar ligeramente los procesos de diferenciación y desarrollo floral. Debido a esto, se puede inferir que la composición química de las flores de momentos diferentes en el año, o sometidas a condiciones ambientales diferentes, presentarían diferencias visibles en las moléculas que los conforman (Gamboa-de Buen et al., 2013 (2)).

Antecedentes

- Ardoino reportó, en un estudio comparativo en 2006, la actividad *in vitro* del extracto de hojas y corteza de *Prosopis flexuosa* sobre *Brucella canis*.
- Salinas y colaboradores reportaron, en un estudio comparativo realizado en 2009, la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos y cetónicos de hojas de *Prosopis laevigata*.
- Toursarkissian (1980), reporta el uso de *Prosopis alba* para aliviar problemas gastrointestinales y como astringente.
- Corzo y colaboradores (2009), utilizaron extractos de las hojas de *Prosopis alba* para identificar su actividad antimicrobiana contra diferentes cepas bacterianas.
- Maidana et al. (2008), reportaron actividad antimicrobiana de mieles monoflorales de *Prosopis sp.* en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureoginosa* y *Escherichia coli*.
- Bussman et al., (2009), reportaron el uso tradicional de *Prosopis pallida* y comprobaron su efecto antimicrobiano utilizando un extracto alcohólico sobre *Staphylococcus aureus*.
- Cunha reportó en 2012, la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de hojas y corteza de *Prosopis juliflora* sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*
- Bezerra (2014), reportó una alta actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de *Prosopis juliflora* contra varias cepas de *Escherichia coli*.
- Soares da Silva et al., (2015), reportaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hojas y corteza de *Prosopis juliflora* sobre cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*.
- Castro (2016), estudió las propiedades antibacterianas de la flor de *Prosopis laevigata* en varias especies bacterianas.

Justificación

Debido a que se ha reportado con anterioridad el uso de infusiones de mezquite (*Prosopis sp.*) en el tratamiento de infecciones gastrointestinales y oculares, y dado que la especie se desarrolla en zonas de condiciones ambientales cambiantes, se buscó identificar las posibles diferencias en la efectividad del tratamiento con extractos de flores de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd) M.C. Jhonst colectados en dos estaciones, determinando cuál es la estación que presenta condiciones apropiadas para la producción de compuestos antimicrobianos.

Problema.

¿Variará la actividad antimicrobiana de los extractos de *P. laevigata*, obtenidos en diferentes condiciones ambientales aunque la colecta sea realizada en la misma zona?

Hipótesis

Las plantas, al ser expuestas a diferentes tipos de estrés, producen compuestos que les permiten mantener su homeostasis, por lo que los extractos obtenidos de colectas realizadas en diferentes condiciones ambientales mostrarán diferencias significativas en cuanto su composición y por tanto, su efecto antimicrobiano.

Objetivo general

Comparar el efecto antimicrobiano de dos extractos de *Prosopis laevigata* obtenidos de plantas colectadas en dos estaciones.

Objetivos particulares

- Colectar flores de *Prosopis laevigata* en dos temporadas distintas.
- Obtener los extractos metanólicos del material obtenido en las colectas.
- Determinar cualitativamente el efecto antimicrobiano de los extractos.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos.

- Determinar la Concentración Fungicida Mínima (CFM) de los extractos en hongos levaduriformes y en hongos filamentosos.
- Evaluar la toxicidad por medio del ensayo en larvas nauplio de *Artemia salina*.
- Cuantificar la Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) de los extractos por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).
- Cuantificar la Concentración de Fenoles Totales (CFT), la Concentración de Flavonoides Totales y la Concentración de Alcaloides Totales por espectrofotometría.
- Cuantificar las xantofilas totales por medio de Espectrometría Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- Analizar la composición de los extractos por medio de Espectrometría Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas y Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

Materiales y método

a) Colecta del material

Las colectas se realizaron durante los meses de febrero y marzo de 2015 en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el Valle de San Rafael Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte y 97°07' y 97°09' longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m snm.

Obtención de los extractos metanólicos

Los extractos se obtuvieron por el método de maceración (Domínguez, 1973). Para tal fin, se pesaron las flores de las muestras, previamente separadas del resto del material biológico y se colocaron en un matraz con metanol, para posteriormente obtener el extracto metanólico crudo, que se filtró y destiló a presión reducida utilizando un rotavapor. El rendimiento del extracto se determinó en relación al peso seco de las flores.

b) Pruebas biológicas

Actividad antibacteriana

- Evaluación cualitativa

Se realizó mediante la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer, para lo cual, se impregnaron sensidiscos con 2 mg del extracto a probar; como control positivo se usaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol.

-Evaluación cuantitativa

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó la microtécnica de dilución en caldo, con un abanico de concentraciones del extracto metanólico. Las cajas se inocularon con 50 µg de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL y se incubaron por 24 horas.

Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano

Para evaluar la actividad de ambos extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano, se utilizó una cepa Gram negativa y una Gram positiva, monitoreándose el crecimiento de éstas durante 24 horas al ser expuestas a diferentes concentraciones de los extractos (1/2 CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Muroi et al., 1993).

Actividad antifúngica

-Evaluación cualitativa sobre hongos levaduriformes

Se realizó de acuerdo con el método de difusión en agar. Los sensidiscos se impregnaron con 4 mg del extracto metanólico; para el control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de Nistatina.

-Evaluación cualitativa de hongos filamentosos

Se realizó por medio de la técnica de inhibición del crecimiento radial usando una concentración de 4mg Por disco del extracto metanólico y como control positivo Ketoconazol a una concentración de 7 µg por sensidisco.

-Evaluación cuantitativa

Para la determinación de la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se realizó el método de inhibición del crecimiento radial reportada por Wang y Bun, 2002.

-Toxicidad general

Se realizó el ensayo de toxicidad general mediante el modelo de *Artemia salina*. Para tal fin, se emplearon larvas nauplio para evaluar la toxicidad de los compuestos de los extractos. Se colocaron 10 larvas por tubo vial para exponerlas a los compuestos presentes en los extractos y a un control positivo de ácido gálico a tres concentraciones (10, 100 y 1000 ppm) para dejarlas durante 24 horas. La letalidad de los extractos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{letalidad} = (IM/IV) * 100$$

Dónde: IM= Individuos muertos; IV= Individuos vivos.

A partir de los datos obtenidos se elaboró una curva patrón y calculó la concentración letal media (CL_{50}) con el modelo de la curva.

c) Pruebas químicas

Actividad antioxidante del extracto

Se determinó por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1picrilhidracil (DPPH). Se cuantificó la Concentración Antioxidante Media (CA_{50}), utilizando las concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo se utilizó catequina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como blanco se usaron pozos con 200 μg de metanol grado HPLC.

Fenoles Totales

La Concentración de Fenoles Totales (CFT) se cuantificó por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redox por el método modificado de Singleton et al., 1999. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico en una solución estándar de 200 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta solución se tomaron alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.0625, 0.125, 0.5 y 1 mg/mL).

Flavonoides Totales

Se determinó por medio del método de Dowd, empleando una solución de AlCl_3 al 2%. Se realizó una curva de quercetina a diferentes concentraciones (1-10 $0\mu\text{g/mL}$). Se determinó la absorbancia a 415 nm, y los resultados se expresaron como μg equivalentes de quercetina por gramo de extracto de flor de mezquite ($\mu\text{g eQ/g}$).

Alcaloides Totales

Se determinó por medio de la técnica de Shamsa et al. (2008), utilizando para ello, verde de bromocresol. Se realizó una curva patrón con atropina a diferentes concentraciones (0.02-0.1 mg/mL). Se determinó la absorbancia a 470 nm y los resultados se expresaron como mg equivalentes de atropina por gramo de mezquite (mg eA/g).

Cuantificación de xantofilas totales por espectrometría

Se realizó para la cuantificación de la proporción de xantofilas totales en pigmentos. La técnica se basa en la saponificación de los pigmentos en una disolución extractora HEAT (hexano: etanol: acetona: tolueno (10:6:7:7)) y se determinó la absorbancia de la epifase a 474 nm. El resultado se expresó en gramos de xantofilas por kilogramos de muestra (gXT/KgM).

Perfil de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Este método se utilizó para la identificación de xantofilas totales en los extractos, y la separación se basó en la migración diferencial debida a la polaridad de la molécula y la detección por absorbancia de la molécula. Para tal fin, se empleó una columna Allsphere ODS-1 u leght 250x4.6 mm y con tamaño de partícula de 5 µm, corriendo la muestra con dos fases: Fase A (Acetronilo: Metanol: Tris-HCl 0.1 M pH 8 (72:8:3); y Fase B (Metanol: Hexano (40:10), en un tiempo de 15 minutos de flujo detector (Apéndice 14).

Caracterización química de los extractos.

La composición química de los extractos se estudió mediante una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS por sus siglas en inglés) (Apéndice 14), una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) (Apéndice 15) y una Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a una Espectrometría de Masas (HPLC-MS por sus siglas en inglés) (Apéndice 16).

Resultados

a) Colecta del material

El material se colectó en el municipio de Coxcatlán, Puebla, en dos meses diferentes: la primera colecta se realizó en febrero y la segunda en marzo del año 2015

Obtención de los extractos metanólicos

Los rendimientos de los extractos obtenidos fueron de 18.95% para la primera colecta y de 22.93% para la segunda.

b) Pruebas biológicas

Actividad antibacteriana

- Evaluación cualitativa

Se obtuvieron los halos de inhibición, que presentaron los extractos de las flores de *Prosopis laevigata* al interactuar con diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas y que se muestran en el cuadro 1 y la figura 1.

Cuadro 1. Actividad antibacteriana de los extractos de *P. laevigata*.

	CEPA	Cloranfenicol (mm)	Colecta de febrero (mm)*	Colecta de marzo (mm)
1	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC35668	33.00 \pm 1.00	IND	23.66 \pm 0.58 27.00 \pm 0.00**
2	<i>Streptococcus mutans</i> CDBB-B-1455	30.00 \pm 1.00	7.33 \pm 0.58	23.33 \pm 0.58 26.33 \pm 0.58**
3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	18.66 \pm 1.52	13.00 \pm 0.00	17.00 \pm 1.00 20.00 \pm 0.00**
4	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19.66 \pm 0.57	7.00 \pm 0.00	15.00 \pm 2.00
5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	22.66 \pm 1.52	17.00 \pm 0.00	21.33 \pm 0.58
6	<i>Staphylococcus aureus</i> 85S	19.66 \pm 1.52	10.00 \pm 0.00	18.33 \pm 1.154
7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> caso clínico	29.00 \pm 0.00	IND	7.33 \pm 0.58

				25.00 \pm 1.00**
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	25.33 \pm 1.52	IND	19.66 \pm 1.53
9	<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	27.33 \pm 1.52	10.2 \pm 0.44	19.33 \pm 1.154 22.5 \pm 3.54**
10	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	27.66 \pm 1.52	IND	18.66 \pm 0.58 26.00 \pm 2.00**
11	<i>Actinomyces viscosus</i> WFCC 449	24.44 \pm 1.15	IND	20.33 \pm 0.58
12	<i>Pseudomonas aureoginosa</i> CDBB-B-999	21.33 \pm 0.57	14.00 \pm 1.00	19.66 \pm 0.58
13	<i>Pantoea agglomerans</i> CDBB-B-959	20.00 \pm 1.00	IND	17.66 \pm 1.154
14	<i>Enterobacter aerogenes</i> CBB-B-958	23.00 \pm 1.73	IND	7.00 \pm 0.00
15	<i>Enterobacter coloaecae</i>	23.00 \pm 0.00	IND	18.00 \pm 0.00
16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	20.33 \pm 0.58	IND	21.00 \pm 1.00
17	<i>Escherichia coli</i> , caso clínico 1	20.00 \pm 0.00	5.00 \pm 0.00	10.66 \pm 0.58 13.00 \pm 3.46**
18	<i>Escherichia coli</i> , caso clínico 2	24 \pm 3.46	18.33 \pm 2.88	12.66 \pm 1.154
19	<i>Escherichia coli</i> 28-MR	24.66 \pm 0.58	IND	10.66 \pm 5.13
20	<i>Shigella flexneri</i>	21.00 \pm 1.00	IND	12.00 \pm 0.00
21	<i>Proteus mirabilis</i> , caso clínico	7.00 \pm 0.00	5.00 \pm 0.00	7.00 \pm 0.00
22	<i>Vibrio cholera</i> , caso clínico	24.66 \pm 0.58	8.20 \pm 0.44	27.00 \pm 2.65
23	<i>Salmonella typhimurum</i>	9.00 \pm 0.00	6.20 \pm 0.44	11.66 \pm 0.58
24	<i>Vibrio cholera</i> CDBB-1159	31.00 \pm 1.00	8.20 \pm 0.44	8.66 \pm 0.58
25	<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B-968	16.66 \pm 0.58	6.00 \pm 0.00	14.00 \pm 1.00
26	<i>Salmonella typhi</i> CDBB-B-1111	26.33 \pm 2.52	6.00 \pm 0.00	20.33 \pm 1.154

IND= indeterminado. Sensidiscos con los extractos de *P. laevigata* con una concentración de 2mg/mL. *Datos obtenidos de Castro, 2016. **Doble halo; el valor más grande indica una disminución en la densidad del cultivo después de 24 horas de haberse colocado los sensidiscos.

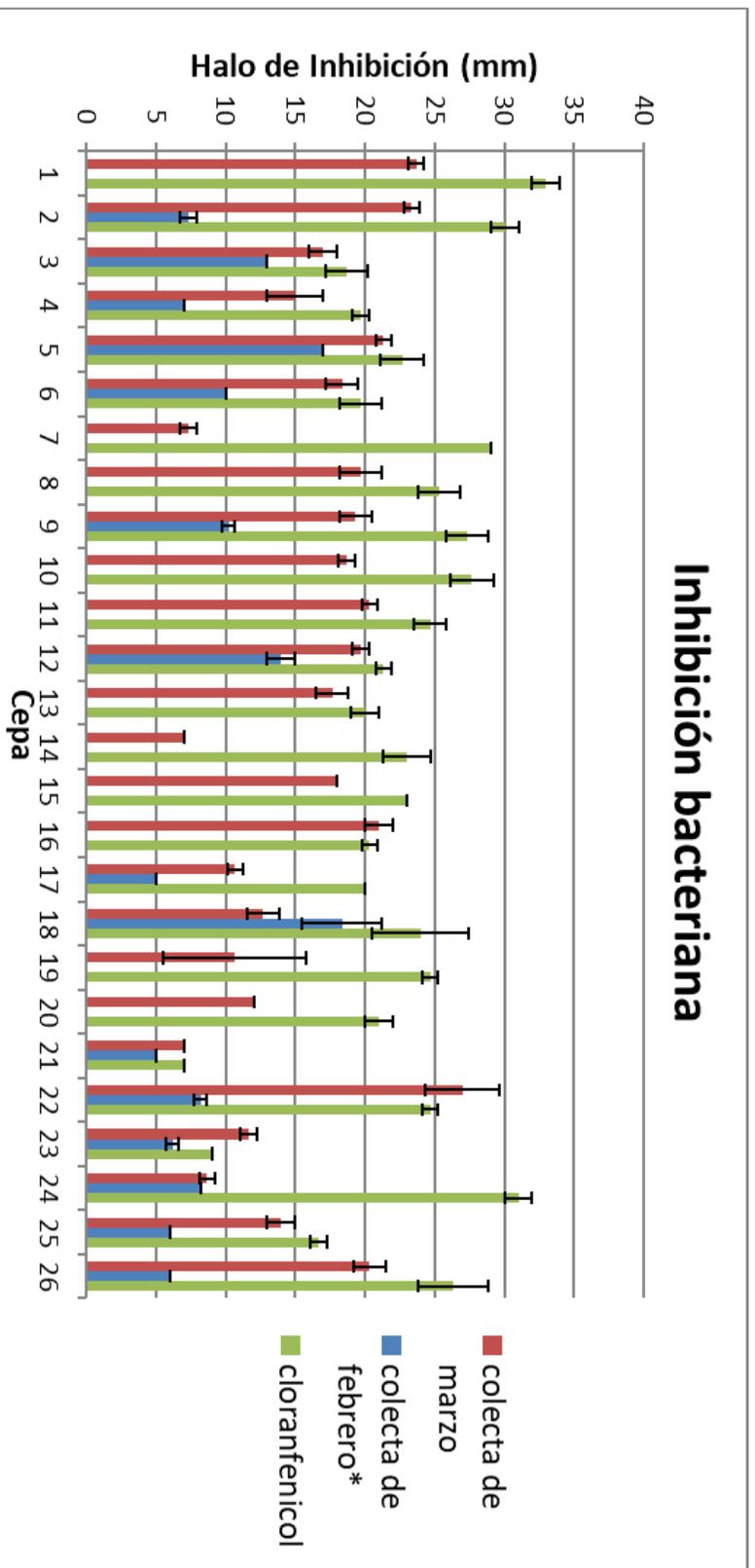


Figura 1. Halos de inhibición bacteriana de ambos extractos. Los números se corresponden con los marcados en el cuadro 1.

En el cuadro 1 y la figura 1 se observa que el cloranfenicol tuvo halos de mayor tamaño que ambos extractos. Sin embargo, se observa una gran diferencia entre los dos extractos, observándose una actividad inhibitoria mayor del extracto de marzo en casi todos los casos.

Para refinar mejor la visión sobre la actividad de los extractos, se agruparon las bacterias por tipo (es decir, por Gram positivas y Gram negativas) y se compararon los promedios de los grupos para observar mejor la actividad inhibitoria de ambos extractos. El resultado de esto se observa en la figura 2.

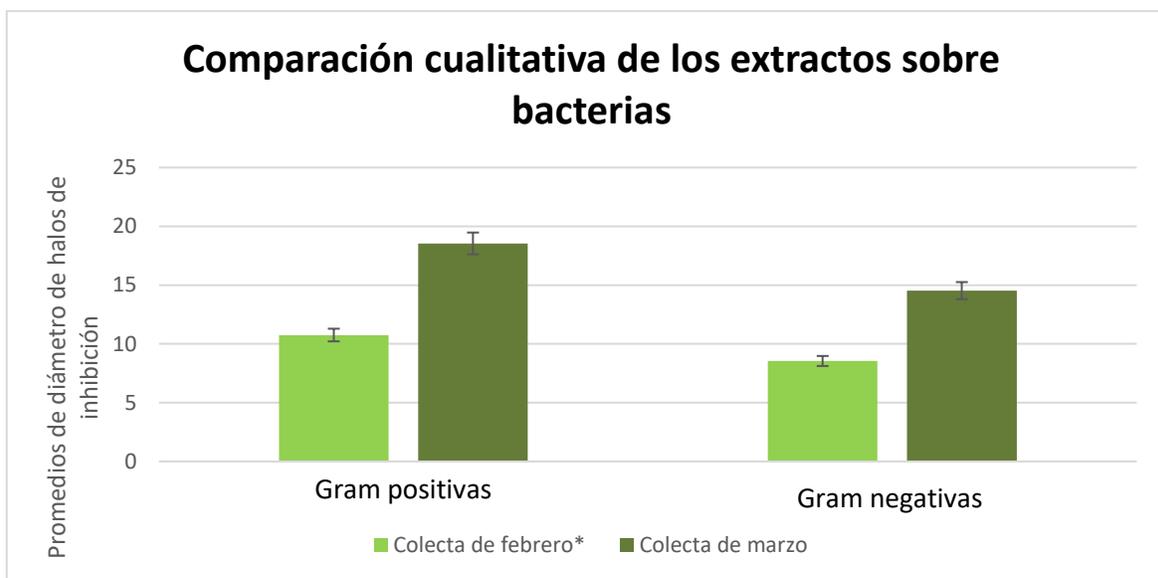


Figura 2. Comparación cualitativa de los extractos sobre bacterias por tipo bacteriano. *Datos obtenidos de Castro, 2016.

En la figura 2 se observan dos fenómenos: el primero de ellos es que ambos extractos presentan claras diferencias en su actividad inhibitoria frente a los dos grupos de cepas, siendo con las bacterias Gram positivas con las que se obtuvo una mayor actividad; el segundo fenómeno observable es que en ambos grupos, el extracto de las flores colectadas en marzo presentó una mayor actividad promedio sobre las cepas bacterianas.



Figura 3. Halos de inhibición del extracto de la colecta de febrero (sensidiscos amarillos) y el control positivo Cloramfenicol (sensidiscos blanco) en diferentes cepas bacterianas. (fotografías obtenidas de Castro, 2016).

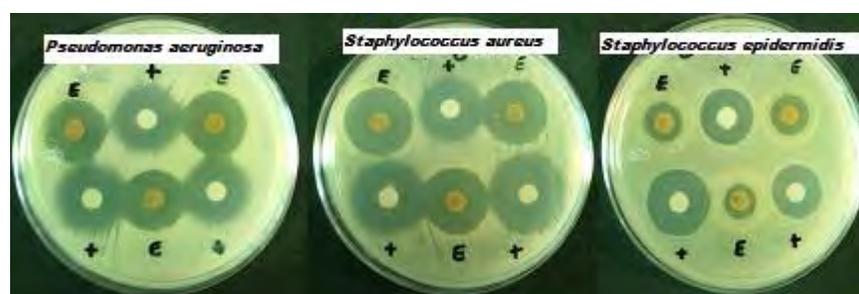


Figura 4. Halos de inhibición obtenidos con el extracto de la colecta de marzo; E= extracto y += sendiscos con cloranfenicol.

-Evaluación cuantitativa

Una vez identificada la actividad de inhibición bacteriana de ambos extractos, se procedió a obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida. Los resultados de la prueba se observan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. CMI y CBM de ambos extractos.

Cepa	CMI Colecta de febrero (mg/mL)*	CBM Colecta de febrero (mg/mL)*	CMI Colecta de marzo (mg/mL)	CBM Colecta de marzo (mg/mL)
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC35668	IND	IND	2.0	4.0
<i>Streptococcus mutans</i> CDBB-B-1455	IND	IND	IND	IND

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	2.5	5.0	1.0	2.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2.5	5.0	2.0	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	0.312	0.624	2.0	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i> 85S	0.312	0.624	4.0	8.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> caso clínico	IND	IND	0.5	1.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	IND	IND	0.5	1.0
<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	IND	IND	2.0	4.0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	IND	IND	4.0	8.0
<i>Actinomyces viscosus</i> WFCC 449	IND	IND	2.0	4.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B-999	0.312	0.624	0.125	0.25
<i>Pantoea agglomerans</i> CDBB-B-959	IND	IND	4.0	8.0
<i>Enterobacter aerogenes</i> CBB-B-958	5.0	10.0	>8.0	>>8.0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.312	0.624	4.0	8.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IND	IND	>8.0	>>8.0
<i>Escherichia coli</i> , caso clínico 1	0.312	0.624	4.0	8.0
<i>Escherichia coli</i> , caso clínico 2	0.312	0.624	2.0	4.0
<i>Escherichia coli</i> 28-MR	IND	IND	4.0	8.0
<i>Shigella flexneri</i>	IND	IND	4.0	8.0
<i>Proteus mirabilis</i> , caso clínico	2.5	5.0	>8.0	>>8.0
<i>Vibrio cholerae</i> , caso clínico	0.312	0.624	4.0	8.0

<i>Salmonella typhimurum</i>	10.0	20.0	>8.0	>>8.0
<i>Vibrio cholerae</i> CDBB-1159	0.625	1.25	0.0625	0.125
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B-968	2.5	5.0	2.0	4.0
<i>Salmonella typhi</i> CDBB-B-1111	1.25	2.5	1.0	2.0

IND= indeterminado. *Datos obtenidos de Castro, 2016

Se observó un cambio evidente en las CMI's y CMB's de los extractos, siendo necesaria una concentración menor del extracto de febrero para la inhibición bacteriana. Solamente algunas bacterias Gram Negativas, como *Vibrio cholerae* CDBB-1159, *Enterobacter aerogenes* CDBB-B-968 y *Salmonella typhi* CDBB-B-1111 presentaron valores más bajos al ser expuestas al extracto de marzo.

Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano

La siguiente prueba realizada fue analizar la actividad de los extractos en la curva de crecimiento bacteriano. Para ello, se seleccionaron dos cepas, una Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 12398) y una Gram negativa (*Vibrio cholerae* CDBB-1159). Para la prueba, se utilizaron tres concentraciones (1/2 CMI, CMI y CBM). Los resultados se graficaron en las figuras 4, 5, 6 y 7.

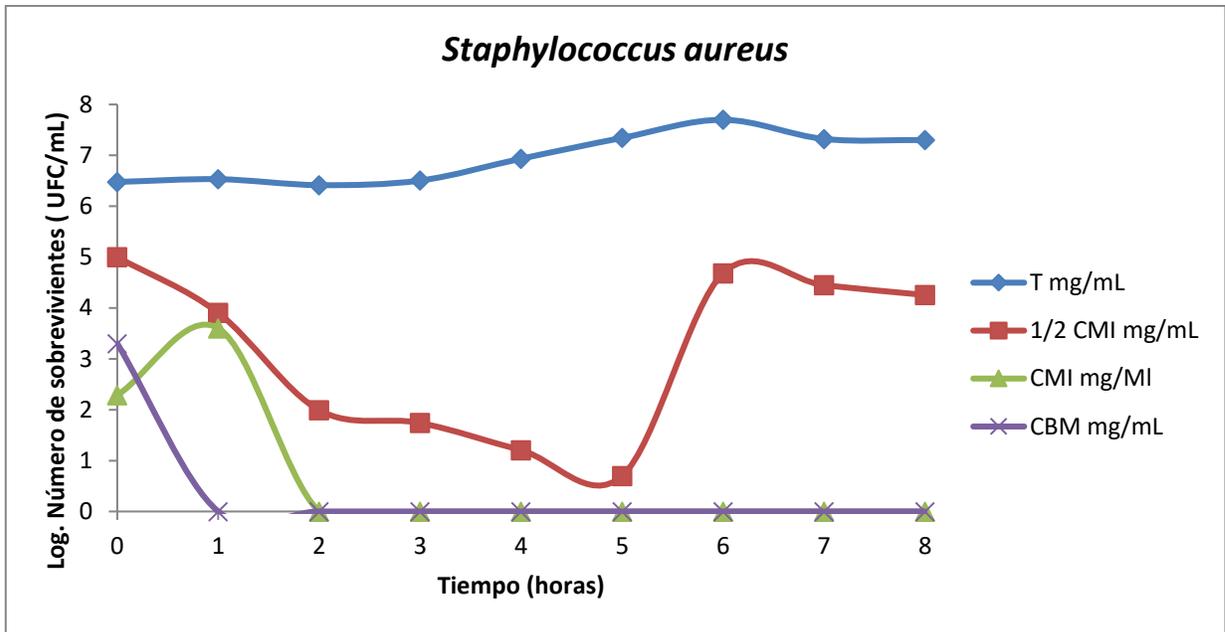


Figura 5. Actividad del extracto metanólico de la colecta de febrero sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 33592. (Datos obtenidos de Castro, 2016). 1/2 CMI= 0.156 mg/mL; CMI= 0.312 mg/mL; CBM= 0.624 mg/mL.

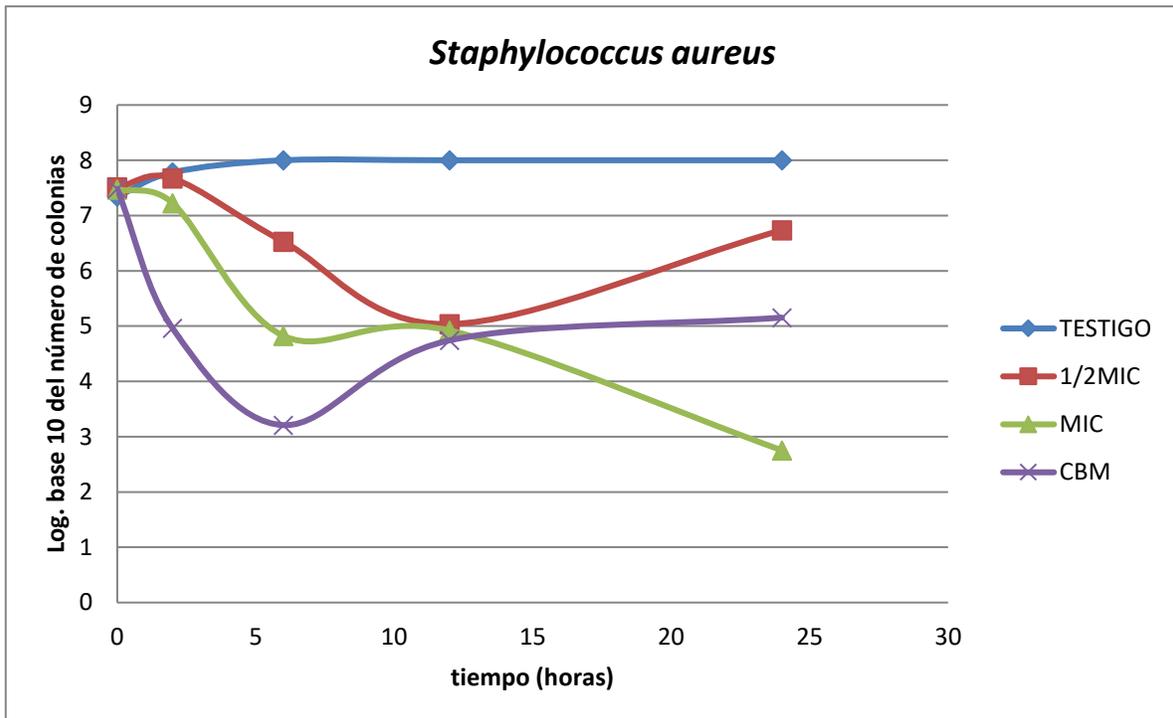


Figura 6. Actividad del extracto metanólico de marzo sobre la curva de crecimiento bacteriano en *Staphylococcus aureus* ATCC 33592. 1/2 MIC= 1 mg/mL; MIC= 2mg/mL; CBM= 4 mg/mL.

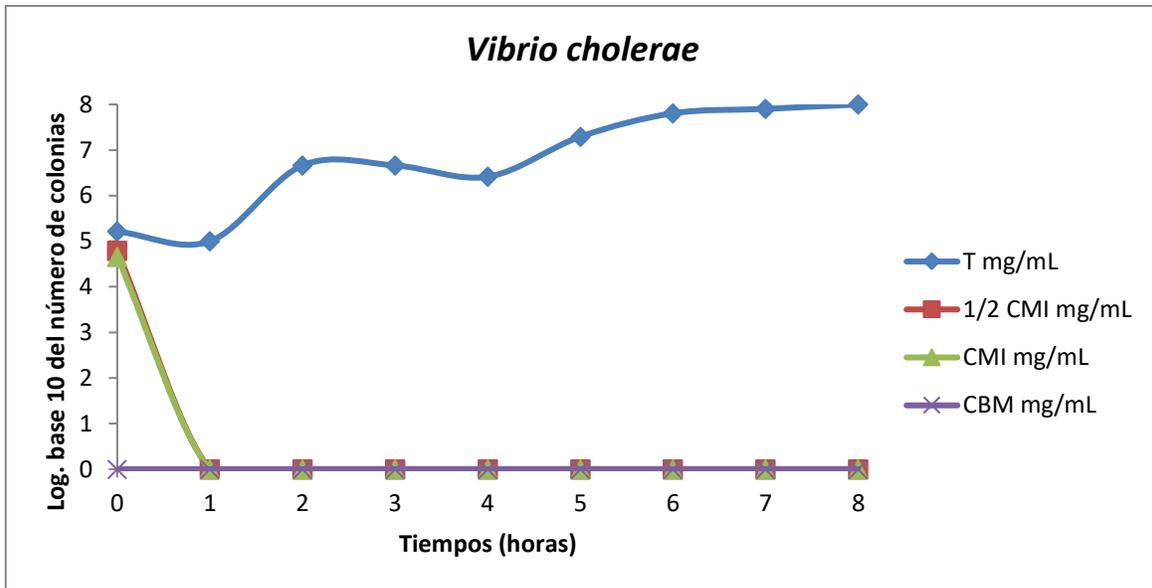


Figura 7. Actividad del extracto metanólico de la colecta de febrero sobre la curva de crecimiento de *Vibrio cholerae* CDBB-B1159 (Datos obtenidos de Castro, 2016). $\frac{1}{2}$ CMI= 0.312 mg/mL; CMI=0.625 mg/mL; CBM= 1.25 mg/mL.

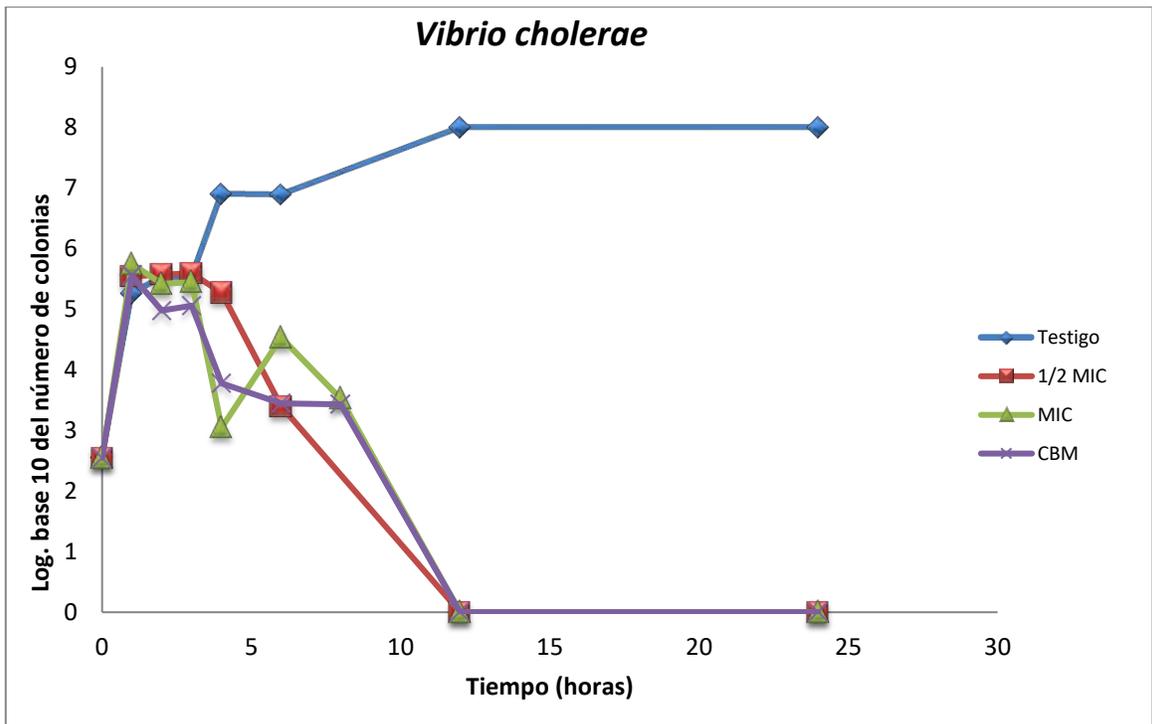


Figura 8. Actividad del extracto metanólico de la colecta de marzo sobre la curva de crecimiento de *Vibrio cholerae* CDBB-B1159. $\frac{1}{2}$ MIC= 0.0312 mg/mL; MIC= 0.0625 mg/mL; CBM= 0.125 mg/mL.

El extracto de febrero presenta un efecto bactericida desde los primeros tiempos al utilizar las concentraciones de CMI, y CBM, y en el caso de la concentración de media CMI sobre *Vibrio cholerae* CDBB-B1159, también ésta resulta efectiva desde el tiempo 1; con respecto a *Staphylococcus aureus* ATCC 33592, la media CMI resulta solamente bacteriostática, ya que la curva presenta una subida en el tiempo 5.

El extracto de marzo, en cambio, tiene un efecto claramente distinto, ya que se observa que, al utilizarse sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 33592, todas las concentraciones utilizadas tienen un comportamiento bacteriostático, con la posible excepción de CMI, con la cual, en los últimos tiempos, se presentó un comportamiento a la baja en la población bacteriana. En cambio, con la cepa *Vibrio cholerae* CDBB-B1159, se observó un efecto bactericida a partir de las doce horas del experimento.

Actividad antifúngica

-Evaluación cualitativa de hongos levaduriformes

Se obtuvieron los halos de inhibición de ambos extractos sobre hongos levaduriformes utilizando para el experimento una concentración de 4 mg/mL, y teniendo como control positivo una concentración de 25 µg de nistatina. Los resultados de esta prueba se observan en el Cuadro 3 y en la figura 7.

Cuadro 3. Halos de inhibición en levaduras utilizando una concentración de 4mg/mL de extracto

	CEPA	Control (mm)	Extracto de febrero (mm)	Extracto de marzo (mm)
1	<i>Candida albicans</i> , caso clínico	12.00 ±1.10	10.00 ±3.11	10.66 ±0.57
2	<i>Candida albicans</i> ATCC 14065	11.50 ±1.38	8.33 ±3.23	9.33 ±0.57
3	<i>Candida albicans</i> CDBB-L-1003	10.83 ±2.48	8.66 ±3.25	8.33 ±1.15
4	<i>Candida tropicalis</i> donada por el Hospital los Ángeles	13.16 ±1.33	11.00 ±3.29	11.33 ±0.58
5	<i>Candida tropicalis</i> CDBB-L-1098	14.83 ±1.17	12.66 ±3.48	14.00 ± 0.00
6	<i>Candida tropicalis</i>	12.50 ±1.87	12.33 ±3.72	12.66 ±0.58

7	<i>Candida glabrata</i> donada por el Hospital los Ángeles	12.16 ±1.72	11.00 ±4.02	12 ± 0.00
8	<i>Criptococcus neoformans</i> Donada por el Laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM	17.33 ±5.24	21.33 ±0.5	19.00 ±1.00
9	<i>Candida albicans</i> ATCC1023	13 ±2.36	9.33 ±0.49	10.33 ±0.58
10	<i>Candida albicans</i> caso clínico	12.83 ±1.33	10±0.44	10± 0.00
11	<i>Candida glabrata</i> CBS 138	13.83 ±1.60	9.66 ±0.51	10± 0.00
12	<i>Candida glabrata</i> , caso clínico	12.66 ±0.82	9.66 ±0.57	10.33 ±0.58

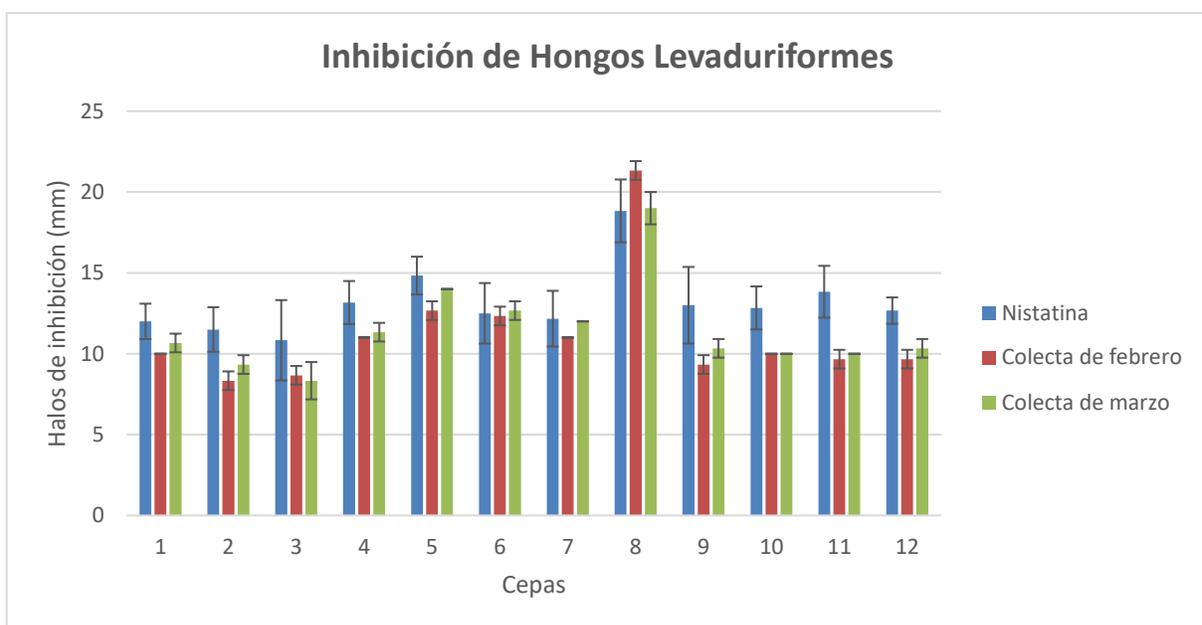


Figura 9. Inhibición de hongos levaduriformes. Los números se corresponden con el número de la cepa encontrado en el cuadro 3.

En la mayoría de las cepas, se observa que ambos extractos tienen una actividad ligeramente menor que la obtenida con la Nistatina. Sin embargo, entre ellos, se observa que, en casi todos los casos, hay una diferencia significativa en la actividad de ambos, siendo el extracto de marzo el que presenta una mayor capacidad inhibitoria, con excepción de *Candida albicans* CDBB-L-1003 y de *Criptococcus neoformans*, cepas en las que se observa una mayor inhibición con el extracto de febrero.

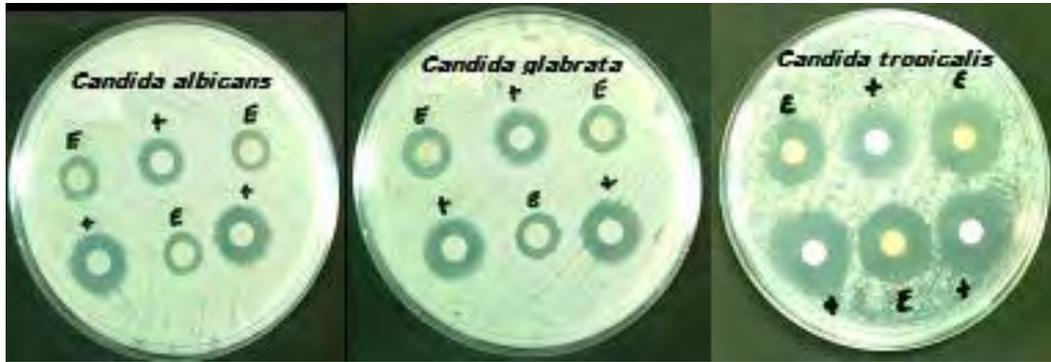


Figura 10 Ejemplo de halos de inhibición de crecimiento de hongos levaduriformes obtenidos con el extracto de la colecta de febrero. E= Extracto; += nistatina.



Figura 11. Ejemplo de halos de inhibición de crecimiento de hongos levaduriformes obtenidos con el extracto de la colecta de marzo. E= Extracto; +=nistatina

- Evaluación cuantitativa del efecto de los extractos en hongos levaduriformes

Una vez realizada la prueba cualitativa, se procedió a realizar la evaluación cuantitativa de los extractos sobre tres cepas de hongos levaduriformes, los cuáles fueron *Candida albicans* ATCC 32354, *Candida glabrata* CDBB-L-1536 y *Candida tropicalis* CDBB-L-1098. Los resultados se observan en el cuadro 4.

Cuadro 4. CF₅₀ y CFM de los extractos sobre 3 cepas de *Candida*.

Cepa	Colecta de febrero		Colecta de marzo	
	CF ₅₀	CFM	CF ₅₀	CFM
<i>Candida albicans</i> ATCC 32354	1.25	2.5	1.25	10
<i>Candida glabrata</i> CDBB-L-1536	0.3125	2.5	2.5	10
<i>Candida tropicalis</i> CDBB-L-1098	0.3125	0.625	0.625	10

Las concentraciones están expresadas en mg/mL.

Como se observa en el Cuadro 4, existen diferencias notables en la actividad de los dos extractos sobre las cepas utilizadas, teniendo concentraciones menores de CF₅₀ y de CFM con el extracto de febrero.

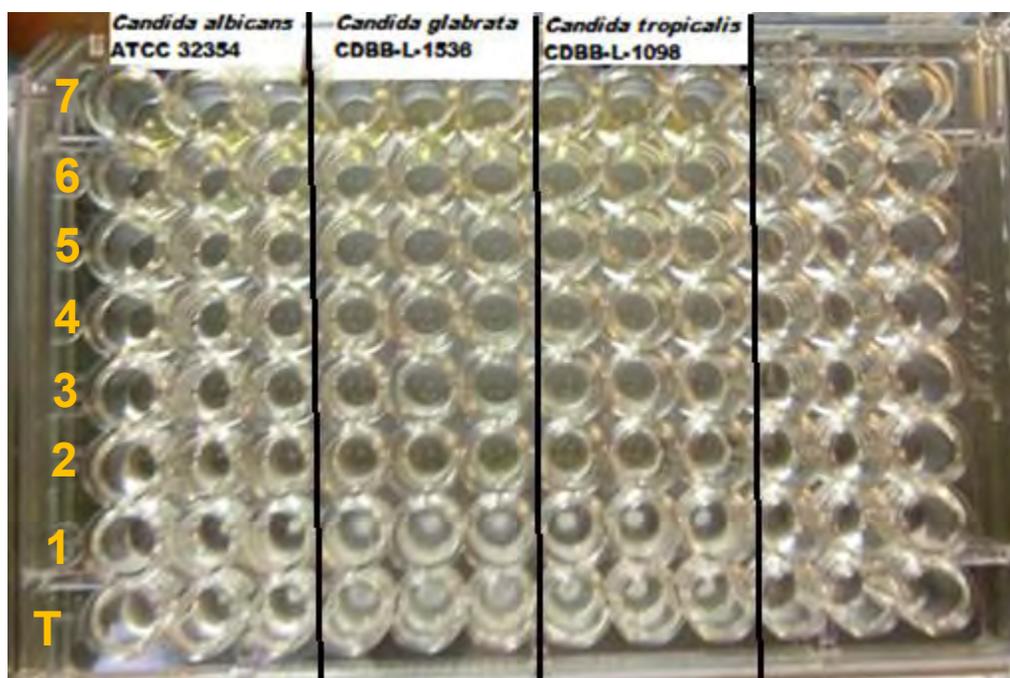


Figura 12. Evaluación cuantitativa de la inhibición del extracto de la colecta de febrero en hongos levaduriformes. T=Testigo; 1=0.156 mg/mL; 2= 0.312 mg/mL; 3=0.625 mg/mL; 4=1.25 mg/mL; 5=2.5 mg/mL; 6=5 mg/mL; 7=10 mg/mL.

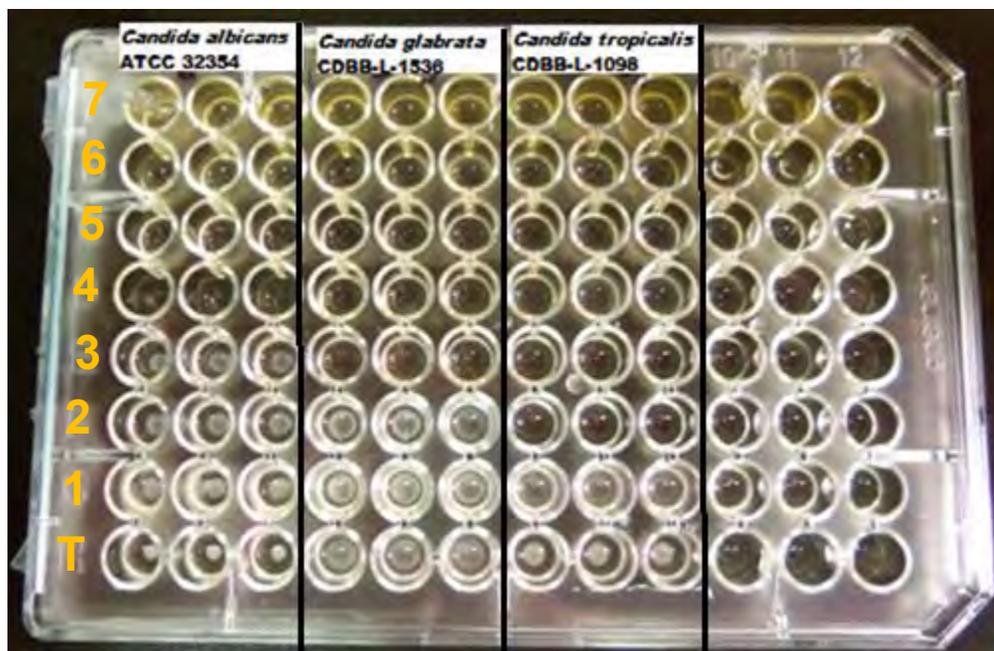


Figura 13. Evaluación cuantitativa de la inhibición del extracto de la colecta de marzo en hongos levaduriformes. T=Testigo; 1=0.156 mg/mL; 2= 0.312 mg/mL; 3=0.625 mg/mL; 4=1.25 mg/mL; 5=2.5 mg/mL; 6=5 mg/mL; 7=10 mg/mL.

-Evaluación cualitativa de hongos filamentosos

La siguiente prueba realizada fue la evaluación cualitativa de los extractos sobre el crecimiento radial de diferentes cepas de hongos filamentosos. Los resultados de este experimento se observan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Actividad de inhibición del crecimiento radial de hongos filamentosos de los dos extractos. ++=Actividad alta; += Actividad media; /= Sin actividad.

Cepa	ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA	
	Colecta febrero	Colecta marzo
<i>Fusarium sporotrichioides</i> ATCC NRLL3299	++	+
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265	++	++
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H1112	++	++
<i>Aspergillus</i> sp. donada por el Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO	+	+
<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H-179	+	+
<i>Rhizoctonia lilacina</i> CDBB-H-306	+	++
<i>Fusarium</i> sp. raíz de gerbera	/	/

<i>Fusarium subglutinas</i>	++	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+



Figura 14. Ejemplo de inhibición del crecimiento radial del micelio de hongos filamentosos con el extracto de la colecta de febrero



Figura 15. Ejemplo de inhibición del crecimiento radial del micelio de hongos filamentosos con el extracto de la colecta de marzo

De forma general se observa que los dos extractos presentan, cualitativamente hablando, actividades similares sobre el crecimiento de las cepas utilizadas en esta prueba.

Evaluación cuantitativa del efecto de los extractos en hongos filamentosos

Una vez obtenidos los resultados de la prueba cualitativa, se procedió a evaluar cuantitativamente los extractos sobre 5 cepas de hongos filamentosos. Los resultados se encuentran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial sobre hongos filamentosos del extracto de febrero.

Concentración	<i>Fusarium sporotrichioides</i> ATCC NRLL3299 (%)	<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H- 265 (%)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H1112 (%)	<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H- 179 (%)	<i>Rhizoctonia lilacina</i> CDBB-H- 306 (%)
0.5	53.33	33.33	48.89	40	0
1	53.33	40	84.44	40	33.33
2	46.67	40	80	42.22	33.33
4	44.44	44.44	86.67	46.67	37.78
6	44.44	46.67	91.11	46.67	40
8	42.22	51.11	93.33	46.67	40

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial sobre hongos filamentosos del extracto de marzo.

Concentración	<i>Fusarium sporotrichioides</i> ATCC NRLL3299 (%)	<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H- 265 (%)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H1112 (%)	<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H- 179 (%)	<i>Rhizoctonia lilacina</i> CDBB-H- 306 (%)
0.5	33.33	42.22	73.33	37.78	33.33
1	51.11	46.67	75.56	42.22	37.78
2	48.89	46.67	82.22	48.89	40
4	46.67	48.89	82.22	53.33	44.44
6	53.33	53.33	82.22	53.33	46.67
8	57.78	53.33	86.67	55.56	44.44

Se observa en ambos cuadros (7 y 8) una actividad similar entre los dos extractos. Sin embargo, es notorio, de forma general, que el extracto de febrero presenta una actividad ligeramente mayor sobre las cepas de *Fusarium sporotrichoides*, *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia lilacina*.

Con los datos anteriores, se realizaron gráficas para cada uno de los hongos filamentosos y los extractos utilizados, con la finalidad de calcular la CF₅₀ (Apéndice 6). Las concentraciones calculadas se colocaron en el cuadro 8. Se observa una mayor efectividad de inhibición en las especies de *Fusarium* (*F. sporotrichioides* ATCC NRLL3299 y *F. moniliforme* CDBB-H-265), en tanto que el extracto de marzo tuvo mayor efectividad sobre *Trichophyton metagrophytes* CDBB-H1112, *Aspergillus niger* CDBB-H-179 y *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306.

Cuadro 8. CF₅₀ Calculadas para ambos extractos sobre las cepas utilizadas en el ensayo

Cepa	Extracto de febrero (mg/mL)	Extracto de marzo (mg/mL)
<i>Fusarium sporotrichioides</i> ATCC NRLL3299	4.28	5.00
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265	5.17	5.29
<i>Trichophyton metagrophytes</i> CDBB-H1112	0.55	0.28
<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H-179	6.94	4.98
<i>Rhizoctonia lilacina</i> CDBB-H-306	8.41	7.36

. Los datos están reportados en mg/mL.

Toxicidad general

La siguiente prueba realizada a los extractos fue identificar el grado de toxicidad general de cada uno de ellos. Para esto, se realizaron las pruebas con el método de toxicidad general utilizando larvas nauplio de *Artemia salina*.

Cuadro 9. Toxicidad de los extractos.

Grupo	% de letalidad colecta de febrero*	% de letalidad colecta de marzo
Concentración 1000 ppm	100	90
Concentración 100 ppm	96	70
Concentración 10 ppm	90	50

* Los datos de la colecta de Febrero fueron obtenidos de Castro, 2016

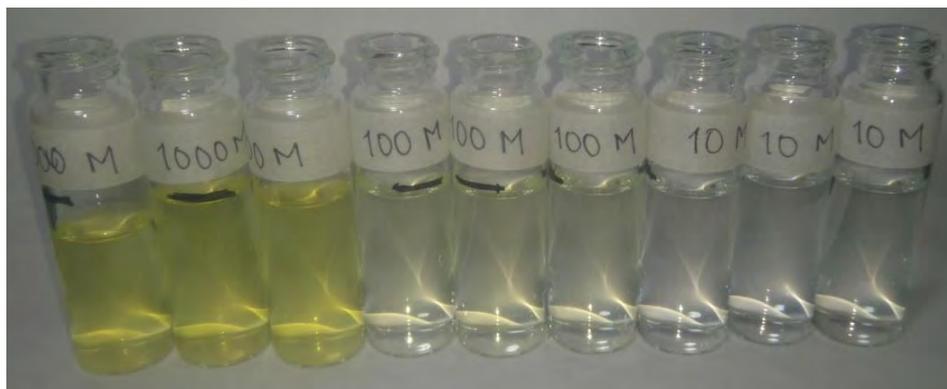


Figura 16. Ensayo de letalidad del extracto de la colecta de febrero (Obtenido de Castro, 2016)



Figura 17. Tratamientos utilizados para la determinación de la toxicidad del extracto de la colecta de marzo. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: tratamiento de 1000, 100 y 10 partes por millón del extracto; 10, 100 y 1000 partes por millón de ácido gálico (Control positivo); 1000 partes por millón de etanol (solvente utilizado dentro del experimento) y solución salina (Control negativo).

Como se observa en el cuadro 9, el extracto de febrero presenta una toxicidad más alta que el extracto de marzo sobre las larvas de *Artemia salina*.

c) Pruebas químicas

Capacidad antioxidante del extracto

Los resultados de la prueba de la capacidad de los dos extractos se encuentran registrados en el cuadro 10. Se observa que ambos extractos, de acuerdo al criterio de Al-Fatimi y colaboradores (2007), presentan una capacidad antioxidante muy baja.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante de ambos extractos

	Colecta Febrero*	Colecta Marzo
CA₅₀	591.38 µg/mL	907.67 µg/mL

* Los datos de la colecta de Febrero fueron obtenidos de Castro, 2016

Composición química de los extractos.

a) Pruebas cualitativas

Para comenzar con la identificación de compuestos presentes en ambos extractos, se procedió, en un primer momento, a realizar pruebas cualitativas para la identificación de la presencia de fenoles, flavonoides y alcaloides. Los resultados se plasmaron en el cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados de las pruebas colorimétricas aplicadas a los extractos

Prueba	Resultado	
	Colecta de febrero*	Colecta de marzo
Fenoles	+	++
Flavonoides	+	+
Dragendorff (Alcaloides)	-	-
Meyer (Alcaloides)	+	+

++=Alta presencia; +=Mediana presencia; y -=Ausencia.* Los datos de la colecta de Febrero fueron obtenidos de Castro, 2016

b) Cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides totales

Después de haberse identificado la presencia de fenoles, flavonoides y alcaloides, se procedió a la cuantificación de estos compuestos. Los resultados se plasmaron en el cuadro 12.

Cuadro 12. Cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides.

Extracto	Fenoles* (mg e AG/g)	Flavonoides* (mg(e Q)/g)	Alcaloides (mg e A/g)
Colecta Febrero	61.00	0.364	66.96666667
Colecta Marzo	488.00	23.2	67.39166667

e AG/gr= equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto; e Q/gr= Equivalentes de quercetina por gramo de extracto; e A/gr= Equivalentes de atropina por gramo de extracto.* Los datos de la colecta de Febrero de fenoles y flavonoides fueron obtenidos de Castro, 2016

Como se observa, hay un incremento importante en las concentraciones de fenoles y flavonoides, en tanto que la concentración de alcaloides tiende a ser similar entre ambos extractos.

c) Cuantificación de xantofilas

Se procedió a realizar la cuantificación de xantofilas, obteniendo como resultado la presencia de estos compuestos, aunque entre los dos extractos se observa una diferencia muy clara en cuanto a la concentración de pigmentos, teniendo una disminución de cerca del 50% entre la colecta de febrero y la de marzo, tal y como se ve en el cuadro 13.

Cuadro 13. Cuantificación de xantofilas totales

	Colecta febrero*	Colecta marzo
Xantofilas totales (g/Kg)	0.18	0.093

. Se encuentran reportadas en gramos de xantofilas por kilogramo de muestra (g/kg). *Los datos de la colecta de febrero fueron obtenidos de Castro, 2016.

d) Identificación de xantofilas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

De acuerdo con los resultados de ambos cromatogramas, sí existe la presencia de pigmentos en los extractos de *P. laevigata*.

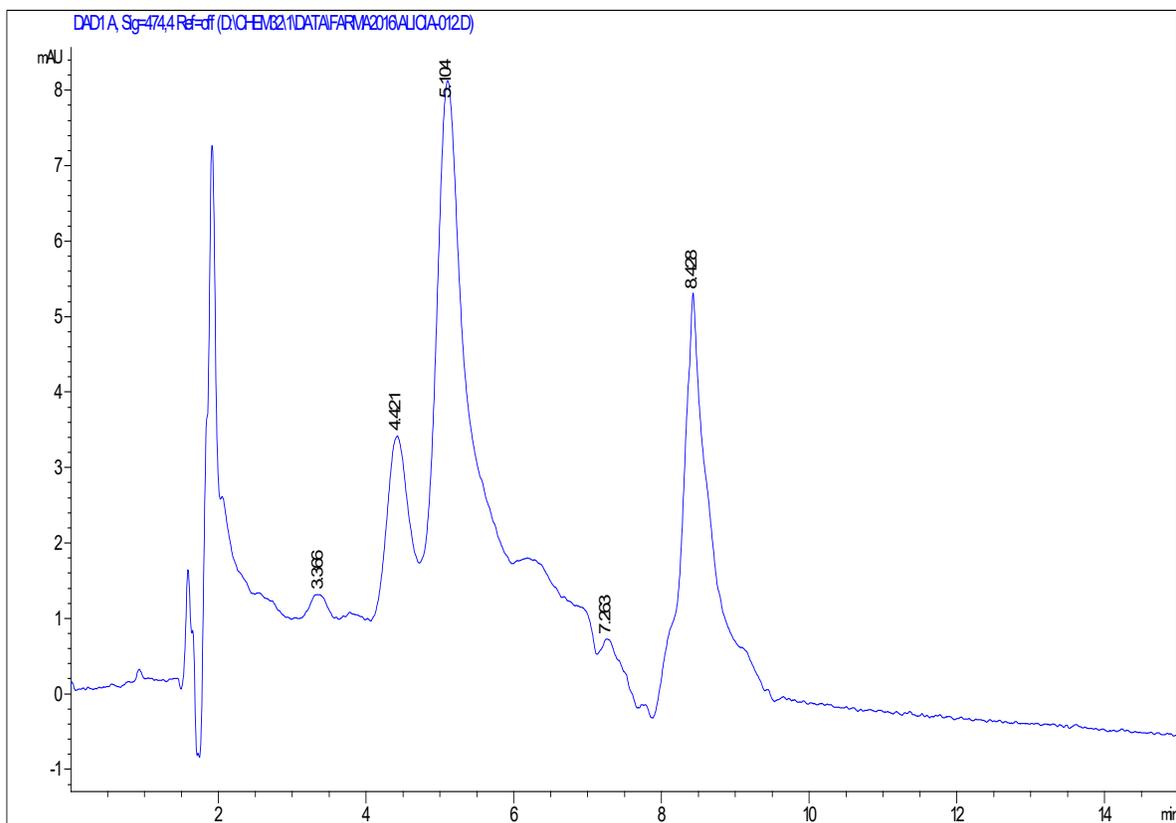
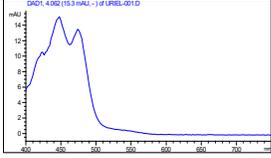


Figura 18. Cromatograma para la identificación de pigmentos del extracto de la colecta de febrero (obtenido de Castro, 2016)

De acuerdo con el cromatograma obtenido, se logró identificar la presencia de diferentes pigmentos, siendo el pico más alto en el extracto de febrero el correspondiente a la luteína, de acuerdo con la biblioteca del dispositivo de HPLC de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de FES Iztacala.

Cuadro 14. Espectro UV con el pico máximo de absorción de pigmentos de *P. laevigata* para la colecta de marzo.

Tiempo de retención	UV λ máx (nm)	Espectro	Tipo de compuesto
5.051	448, 476		Luteína

La determinación se hizo con base en el estándar de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Datos obtenidos de Castro, 2016.

En el extracto de marzo se obtuvo un cromatograma ligeramente diferente, en el que se obtuvo, como en el caso del extracto de febrero, el pico más alto como el correspondiente a la luteína, de acuerdo con la base de datos anteriormente mencionada. El cromatograma se encuentra en la figura 19 y los datos obtenidos fueron plasmados en el cuadro 15.

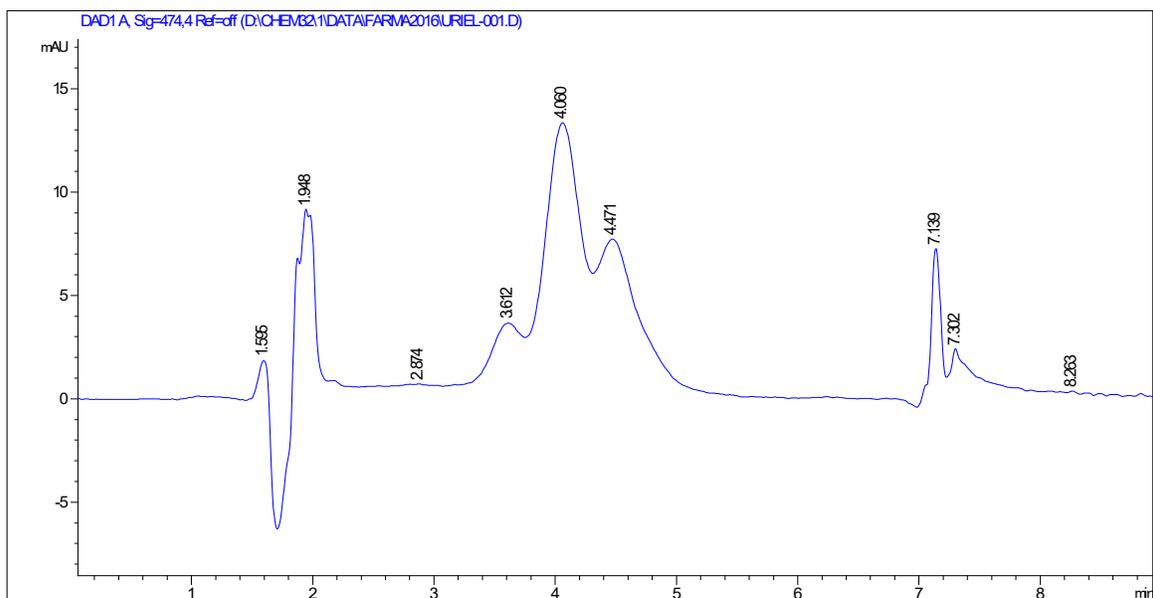
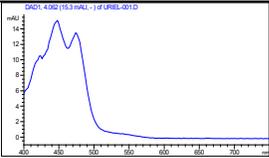


Figura 19. Cromatograma del análisis HPLC de pigmentos de *P. laevigata* realizado con la muestra de la colecta de marzo

Cuadro 15. Espectro UV con el pico máximo de absorción de pigmentos de *P. laevigata* para la colecta de marzo.

Tiempo de retención	UV λ máx (nm)	Espectro	Tipo de compuesto
4.062	448, 474		Luteína

La determinación se hizo con base en el estándar de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

e) Caracterización química de los extractos.

Después de evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *P. laevigata*, se procedió a realizar el análisis químico de éstos, con la finalidad de identificar los posibles compuestos involucrados en dichas actividades. El análisis se realizó, como se mencionó antes, por medio de HPLC, GC-MS y HPLC-MS.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

A continuación, se presentan los cromatogramas correspondientes a los dos extractos (figuras 20 y 21) y los grupos a los que pertenecen las moléculas identificadas a partir del tiempo de retención y el espectro de UV (Cuadros 16 y 17).

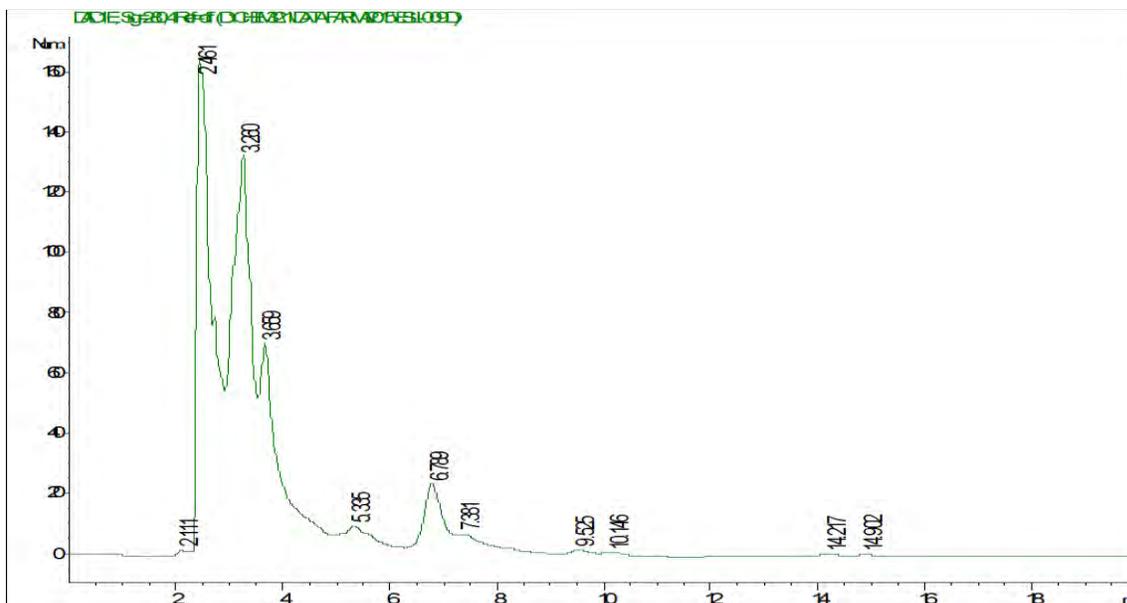


Figura 20. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico de la colecta de febrero (obtenido de Castro, 2016)

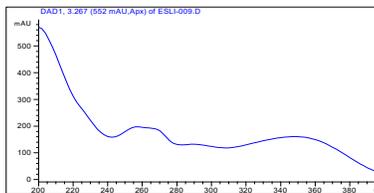
Cabe resaltar que tanto los compuestos del extracto de febrero fueron identificados con estos dos datos, y no se pudieron determinar los compuestos más que a nivel de la familia química a la que pertenecen al no tener coincidencias con la base de datos del equipo utilizado.

Cuadro 16. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto de la colecta de febrero.

Tiempo de retención (min)	UV λ máx (nm)	Espectro	Tipo de compuesto
2.441	270, 332		Flavona

3.267

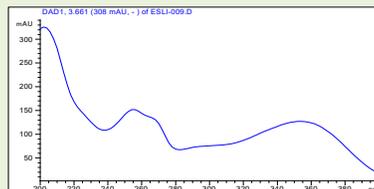
258, 266, 348



Flavonol

3.661

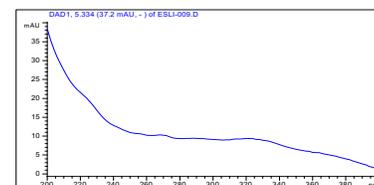
254, 268, 354



Isoflavona

5.334

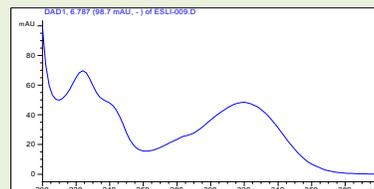
268, 326



Isoflavona

6.787

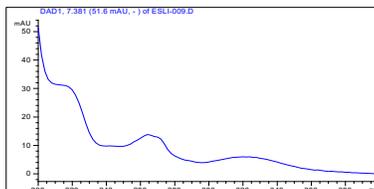
224, 242, 320



Ácido fénolico

7.381

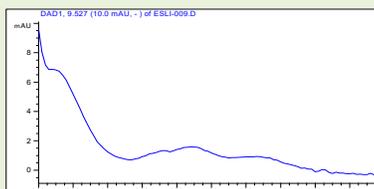
218, 264, 322



Dihidrochalcona

9.527

212, 288

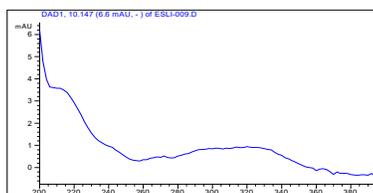


Flavanonol

10.147

214, 316

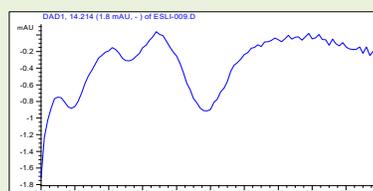
Fenil propanoide



14.214

210, 242, 268

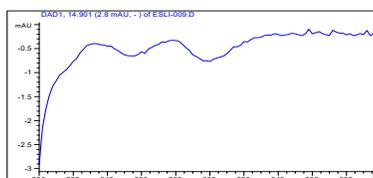
Fenil propanoide



14.901

230, 278

Fenil propanoide



Obtenidos de Castro, 2016.

La siguiente figura se corresponde con el cromatograma del extracto de marzo, el cual presenta algunas similitudes con el cromatograma de febrero.

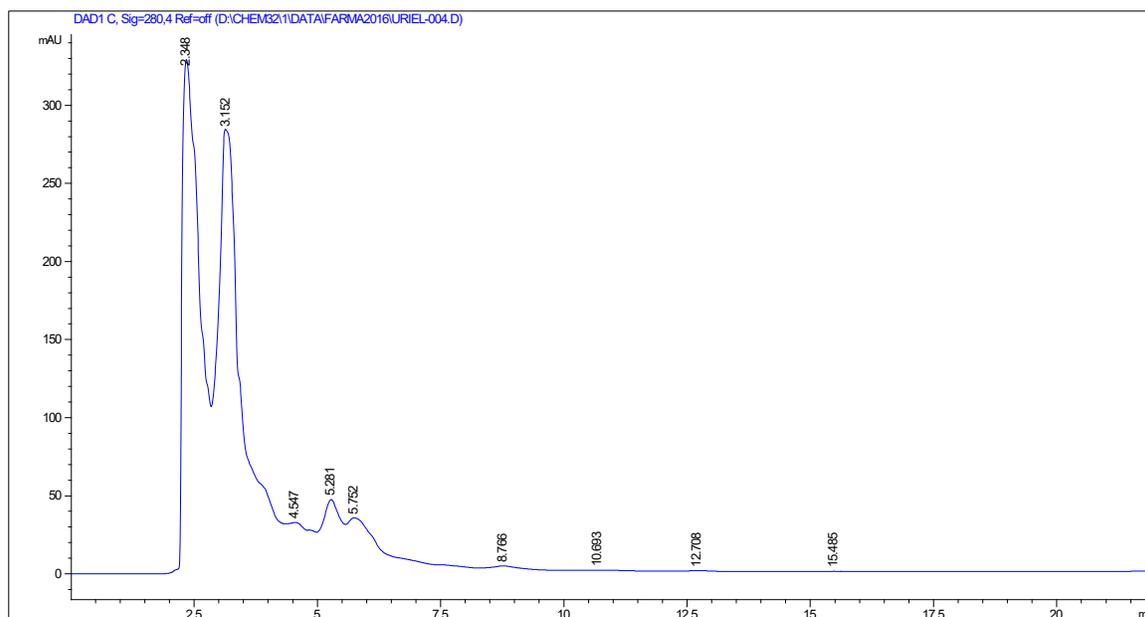
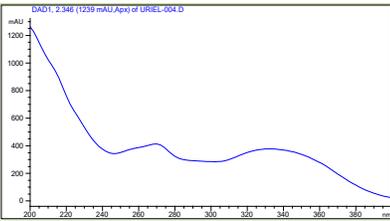
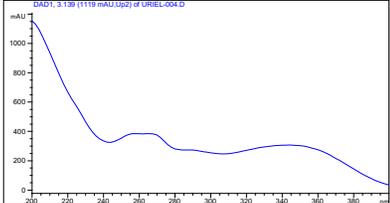
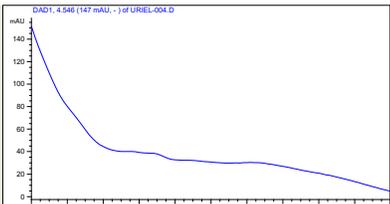
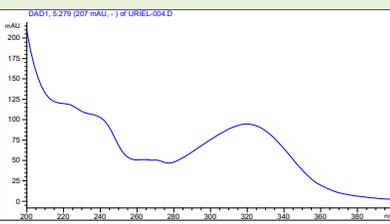
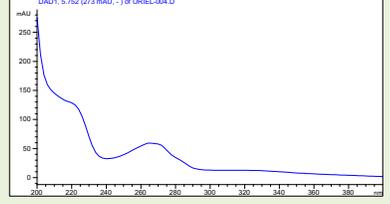


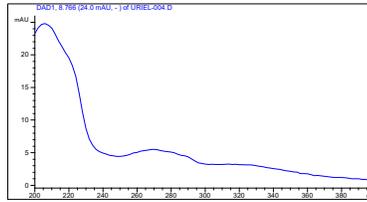
Figura 21. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico de la colecta de marzo.

El cuadro 17 presenta los picos y tiempos de retención obtenidos por el dispositivo. Sin embargo, como en el caso anterior, estos datos no coincidieron con los de la biblioteca de la UBIPRO, por lo que se identificó el grupo químico por medio de los espectros UV decritos en Harborne, 1994.

Cuadro 17. Espectros de UV con los picos máximos de absorción del extracto de la colecta de marzo

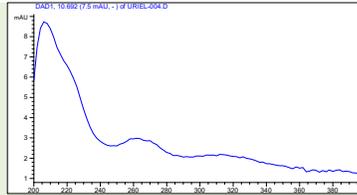
Tiempo de retención	UV λ máx (nm)	Espectro	Tipo de compuesto
2.346	256, 270, 330		Isoflavona
3.139	254, 266, 290, 346		Flavona
4.546	224, 270, 324		Flavanona
5.279	224, 240, 272, 322		3-Antraquinona
5.752	222, 264, 272		Antraquinona

8.766 206,220,258,272



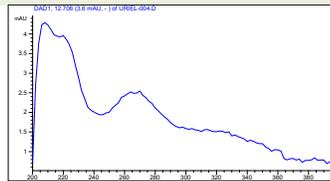
Fenantreno

10.692 208,260,326,358



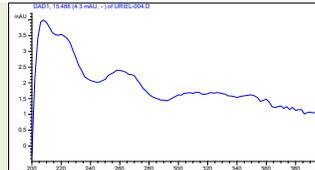
Hidroxicoumarina

12.706 208,220,270



Rotenoide

15.486 208,220,260,352,360



Flavonol

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Extracto de la colecta de febrero

La figura 22 y el cuadro 18 muestran los resultados obtenidos por GC-MS del extracto de la colecta de febrero.

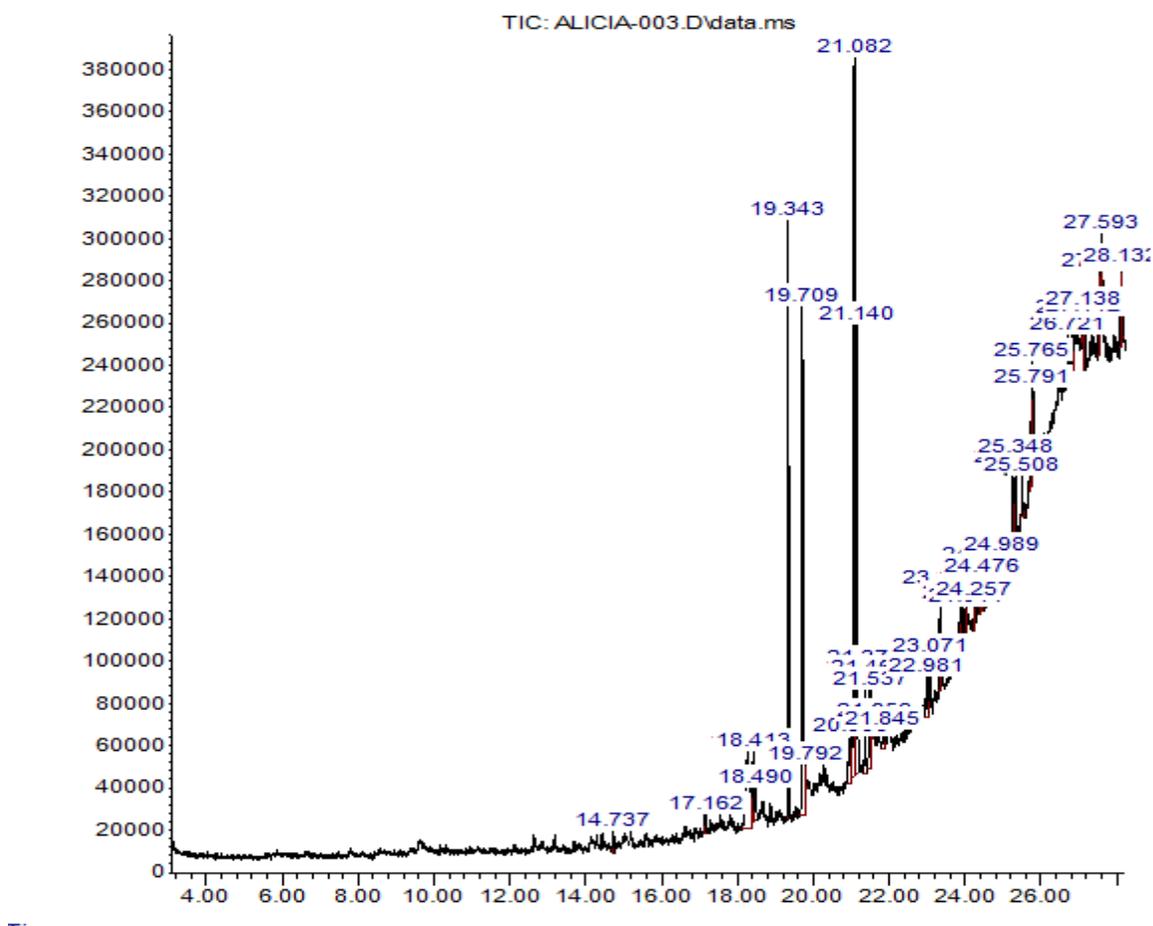
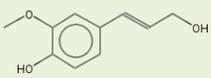
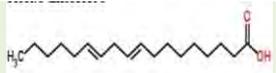
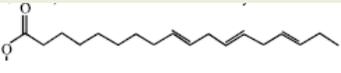
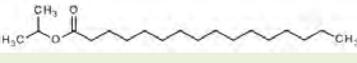


Figura 22. Cromatograma del extracto de la colecta de febrero. Obtenido de Castro, 2016

En el cuadro 18 se observan los principales compuestos detectados por el dispositivo de GC-MS de la UBIPRO a partir de la base de datos del mismo, los cuales fueron identificados por el tiempo de retención. Se añade una columna de las actividades biológicas reportadas para tales compuestos.

Cuadro 18. Compuestos determinados por CG-EM en el extracto de la colecta de febrero.

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

Extracto de la colecta de marzo

Para La colecta de marzo se decidió utilizar dos fracciones: una metanólica y una con diclorometano para realizar CG-MS.

a) Fracción metanólica

Los resultados de la CG-MS están plasmados en la figura 23 (que es el cromatograma obtenido) y el cuadro 19.

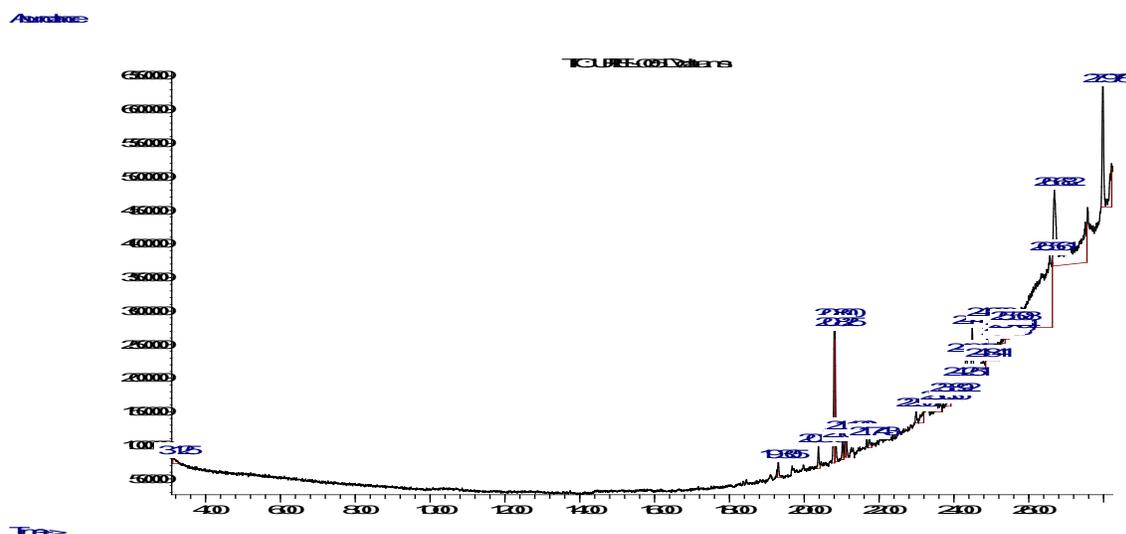
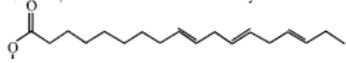
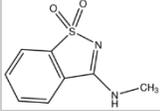


Figura 23. Cromatograma de la fracción metanólica del extracto de marzo.

En el cuadro 19 se observan los compuestos identificados por la biblioteca de compuestos del equipo de GC-MS de la UBIPRO. En Este cuadro se observa el nombre de los compuestos y las actividades biológicas reportadas para cada uno de ellos.

Cuadro 19. Compuestos identificados en la fracción metanólica de la muestra de marzo por GC-MS

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Compuesto	Estructura	Actividad
2	19.305	0.64	Ácido palmítico		Antibacteriano (Zheng et al., 2005). Anticancerígeno (Kumar et al., 2010).

4	20.800	8.55	Ácido linoleico		Antibacteriano (Zheng et al., 2005). Anticancerígeno (Kumar et al., 2010).
19	25.348	0.44	1,2-Benzisothiazol-3-amine tbdms		

b) Fracción de diclorometano

La figura 24 es el cromatograma obtenido con la fracción de marzo, disuelta en diclorometano por el equipo de GC-MS de la UBIPRO. Se observa una gran disimilitud entre los dos cromatogramas de la muestra de marzo, correspondiente a la polaridad de los compuestos disueltos en los solventes.

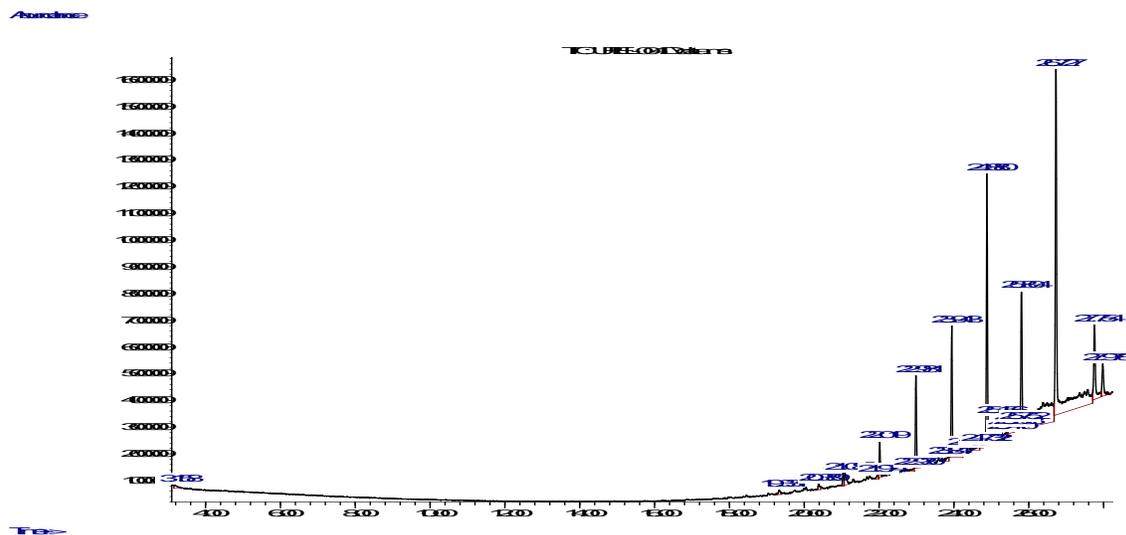


Figura 24. Cromatograma de la fracción obtenida con diclorometano del extracto de marzo

En el cuadro 20 se plasmó el único compuesto identificado por la biblioteca del dispositivo de GC-MS de la UBIPRO, que es el ácido linoleico, el cual, como se observa, abarca el 87% del área total registrada en el cromatograma.

Cuadro 20. Compuestos identificados en la fracción de diclorometano de la muestra de marzo por GC-MS.

Pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Compuesto	Estructura	Actividad
7	22.019	87.05	Ácido linoleico		Antibacteriano (Zheng et al., 2005). Anticancerígeno (Kumar et al., 2010).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)

a) Extracto de febrero

La Figura 25 muestra el cromatograma obtenido por HPLC-MS del extracto de la colecta de febrero, y los compuestos detectados por la biblioteca del dispositivo utilizado. Los compuestos identificados se encuentran en el cuadro 21.

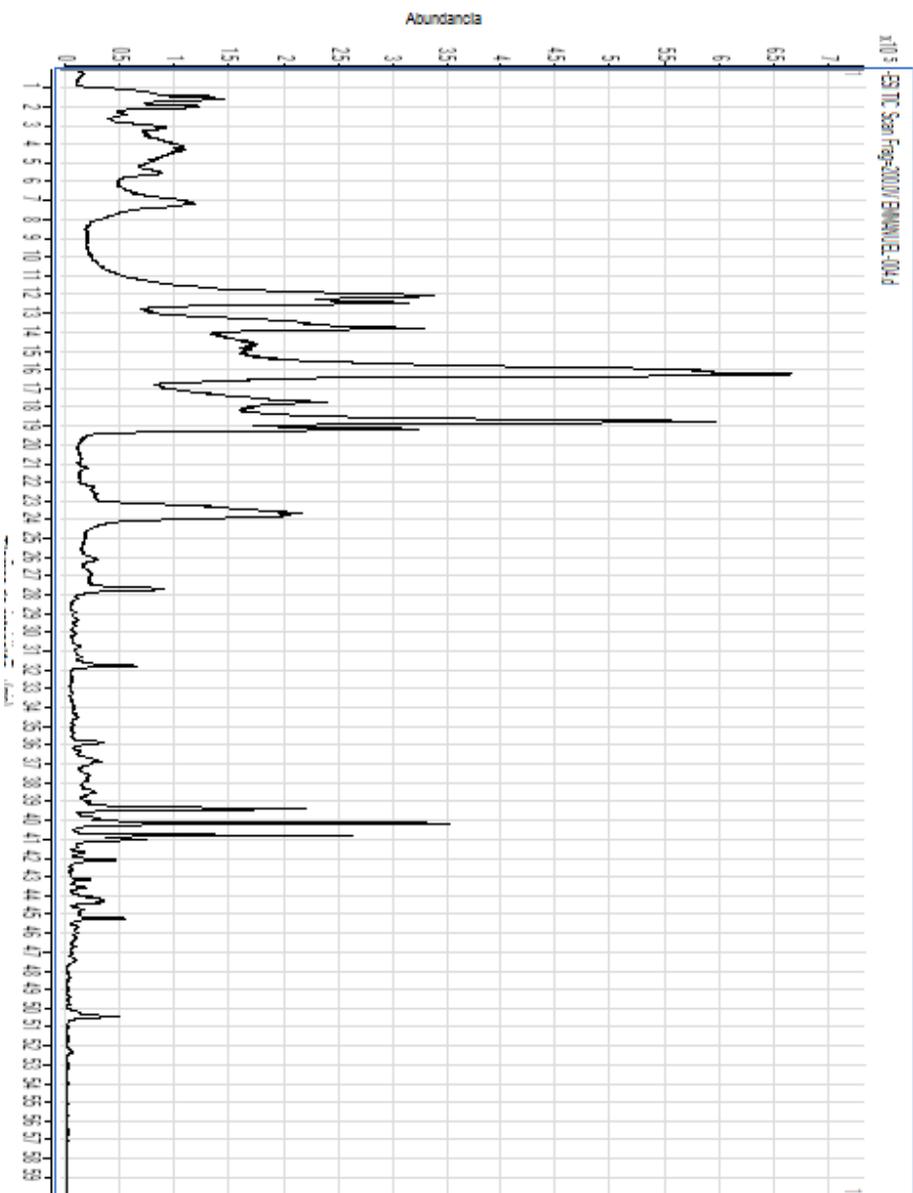


Figura 25. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) del extracto de la colecta de febrero.

En el cuadro 21 se encuentran los compuestos detectados por la biblioteca del dispositivo de HPLC-MS. Estos compuestos fueron Vainillina, Ácido cafeico, Crisina y Acacetina.

Cuadro 21. Análisis del extracto de la colecta de febrero en HPLC-MS

lón (m/z)	Compuesto	Abundancia	Tiempo de retención
96.9611	-----	37982.77	1.511
341.1112	-----	13491.37	1.511
377.0882	-----	42329.7	1.909
304.096	-----	4949.9	3.054
593.154	-----	41866.6	5.578
593.154	-----	74913.2	7.121
563.144	-----	238968	13.727
303.054	-----	133565	13.727
609.151	Vainillina	381978	13.727
151.0049	Ácido caféico	465093	13.761
179.0002	-----	73098.5	16.217
609.15	-----	109744	17.678
593.155	-----	393106	17.678
623.166	-----	228083	18.690
623.167	-----	171793	23.620
623.166	-----	54228.6	27.653
312.258	-----	48279.3	31.720
762.33	-----	173790	39.339
253.2189	Crisina	463237	39.804
279.235	-----	296505	40.102
255.234	-----	227319	40.750
281.25	-----	56386	40.999
283.2659	Acacetina	356491	42.078

b) Extracto de marzo

La Figura 21 muestra el cromatograma obtenido por HPLC-MS del extracto de la colecta de marzo, y los compuestos detectados por la biblioteca del dispositivo utilizado. Los compuestos identificados se encuentran en el cuadro 22.

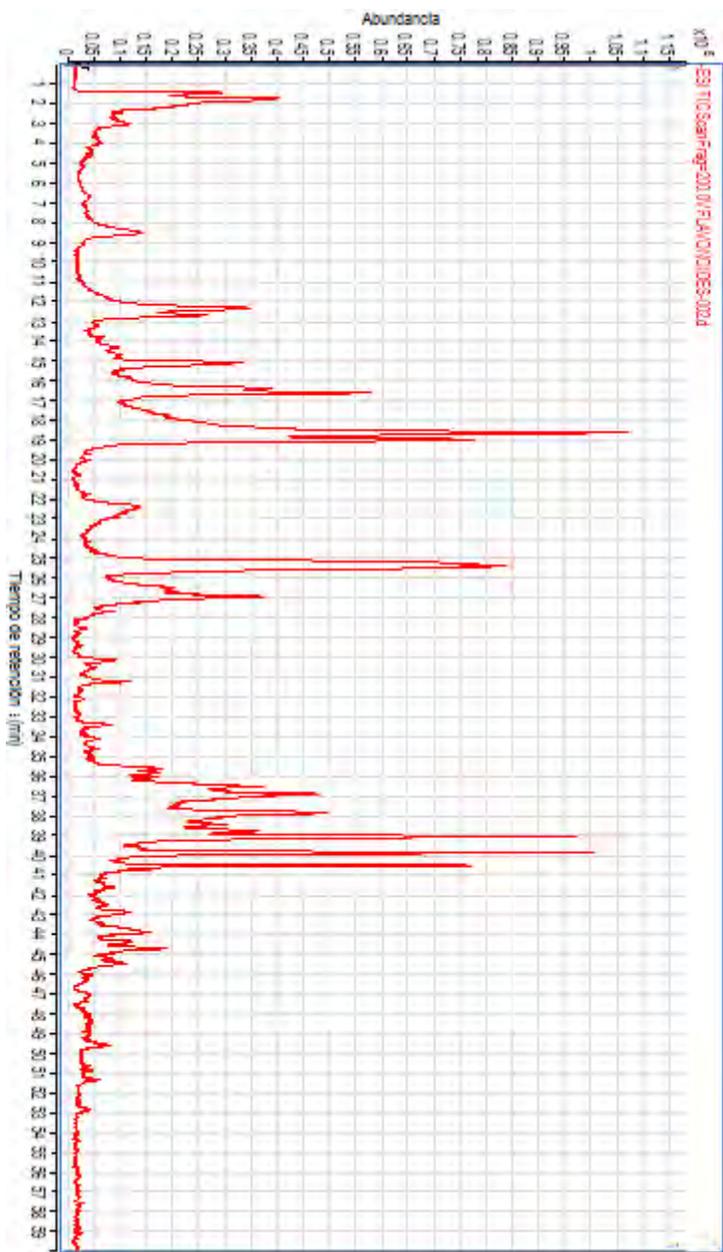


Figura 26. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) del extracto de la colecta de marzo.

En el cuadro 22 Se encuentran los compuestos detectados por la biblioteca del dispositivo de HPLC-MS. Estos compuestos fueron Pinocembrina, Apigenina, Naringenina y Quercetina.

Cuadro 22 Análisis del extracto metanólico de *P. laevigata* en HPLC-MS

Ion (m/z)	compuesto	abundancia	Tiempo de retención
255.0643	Pinocembrina	1230.6	29.336
269.08	Apigenina	2998.51	27.087
271.0599	Naringenina	206	22.946
285.0384	Kaemperol	346.86	26.249
301.0329	Quercetina	627.05	22.448
377.0829	-----	8135.22	1.699
593.1482	-----	10214.95	8.455
563.1377	-----	26386.72	12.306
563.1376	-----	20116.14	12.671
328.247	-----	20900.87	15.078
609.1445	-----	20813.58	16.339
610.1478	-----	7965.63	16.572
623.1592	-----	74226.16	18.58
623.1589	-----	55434.92	18.929
312.252	-----	65951.07	25.336
674.5828	-----	3629.97	26.863
295.2263	-----	13073.34	36.491
325.183	-----	33986.16	37.802
277.2159	-----	64016.27	38.997
279.2311	-----	74885.22	39.794
255.2308	-----	53995.82	40.458
281.2461	-----	8218.67	40.673
687.5766	-----	3127.82	44.641

Discusión

Dentro de los usos medicinales del Género *Prosopis*, tiene el registro de un uso muy puntual para tratar las infecciones gastrointestinales y en el lavado de heridas para evitar infecciones (Bazán, 2012; Mata, 2009; Flores, 2011). Castro (2016) reportó una importante actividad antibacteriana del extracto obtenido de la floración de *Prosopis laevigata*, hecho que es de sumo interés debido a que es el primer trabajo realizado con el órgano reproductor de la planta. El presente trabajo no sólo se basó en la comprobación de los datos reportados por Castro, sino que tuvo la finalidad de encontrar una relación, de existir, entre la actividad antimicrobiana y la época de recolección del material utilizado.

Para la realización de la comparación, el trabajo se dividió de la siguiente forma: evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos en diferentes meses de colecta (febrero y marzo) y analizar las diferencias en las composiciones de ambos extractos.

La decisión de tomar dos colectas en un periodo de tiempo relativamente corto (un mes), responde al hecho de que el género *Prosopis*, de acuerdo a López (1984) y a Delatorre y colaboradores, (2008) se caracteriza, como la mayoría de las plantas asociadas a la vegetación denominada *matorral xerófilo*, por épocas oportunistas de floración, dependientes, en gran medida, de factores climáticos como la precipitación, la temperatura y la radiación solar. Esta situación origina, como se ha reportado anteriormente (López, 1984; Delatorre et al., 2008), que las plantas de regiones áridas muestren composiciones químicas excepcionalmente diferentes con respecto a la estructura de la planta que se analice (desde las raíces hasta los frutos) y que generalmente, esto reporte actividades biológicas diversas.

Partiendo de las pruebas realizadas por Castro en 2016, se procedió, en un primer momento, a realizar un extracto metanólico con las flores de *Prosopis laevigata* obtenidas en el mes de marzo. Con la segunda colecta, se obtuvo un porcentaje ligeramente mayor, lo que verifica el hecho de que las flores se encontraban en un estadio de desarrollo más avanzado, o que conlleva a una concentración mayor de

productos fotosintéticos y metabolitos secundarios, resultado del metabolismo de la planta para que sus órganos reproductores tengan las mejores condiciones para el desarrollo de un mayor número de embriones viables.

Al evaluarse las propiedades antibacterianas, no se encontraron, en la mayoría de las cepas utilizadas, diferencias significativas ($P= 0.05$; $F= 3.4433$). Lo que sí resulta evidente es que el extracto de la colecta de marzo presenta, en promedio, una mayor actividad antimicrobiana, encontrándose en varias bacterias dos efectos: halos de inhibición donde está ausente el crecimiento bacteriano y halos donde se observa una disminución en la tasa de crecimiento bacteriano, lo que se evidencia en la presencia de zonas alrededor de los halos de inhibición con una densidad visiblemente menor que la observada en regiones donde el extracto no alcanzó a difundir en el medio de cultivo. Los dos extractos muestran halos de inhibición de menor diámetro en comparación con trabajos realizados con otras especies del género *Prosopis*. En 2015, Soares Da Silva y colaboradores reportaron halos de inhibición de tamaño similar a los observados en el extracto de marzo sobre *S. aureus*, *P.aeruginosa* y *E. coli*, pero con cantidades menores a 2 mg/mL (la concentración más alta utilizada por ellos fue de 500 µg/mL).

Por otro lado, la respuesta de las diferentes cepas bacterianas que fueron utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos resulta de gran interés, debido a que se tiene el registro de que la mayoría de las cepas son resistentes, o tienen una sensibilidad media, a un abanico de antibióticos diversos (Apéndice 18), que, al ser contrastado con los halos de inhibición obtenidos, muestran claras diferencias, en especial la mayoría de los halos registrados con el uso del extracto de marzo, cuyos resultados fueron equiparables al uso de antibióticos de amplio espectro pertenecientes a familias como las quinolonas (que actúan sobre la síntesis y metabolismo de ácidos nucleicos), las tetraciclinas (que afectan la síntesis proteica) y el Trimetoprim-Sulfametoxazol, (compuesto que actúa inhibiendo la ruta de síntesis de ácido fólico bacteriano, afectando la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas) (Calvo y Martínez-Martínez, 2009) (Apéndice 18). Entre los dos extractos, el que presenta una actividad promedio mayor es el extracto de la segunda colecta

(marzo), lo que se justifica teniendo en cuenta que el material biológico fue conseguido en una época de mayor humedad y por ello, la planta se ve forzada a producir metabolitos secundarios que le permitan protegerse contra el ataque de organismos patógenos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Cabe aclarar que, aunque las dosis utilizadas de los antibióticos son mucho menores a las utilizadas para la obtención de un efecto bactericida o antimicrobiano en comparación con los extractos, también es cierto que esto se debe a que su acción es atribuible a un efecto sinérgico entre los compuestos que contienen.

Sin embargo, cuando se realizó el análisis cuantitativo, se observó que, en un gran porcentaje de los casos, la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Bactericida Mínima (CMI y CBM) fueron más bajas, en promedio, en el extracto de febrero, que en el de marzo, lo que puede responder a dos fenómenos presentes en la composición de los extractos: la viscosidad de los componentes y la solubilidad de los mismos (Lee, 2004).

Dentro de la influencia de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano, se observa un fenómeno interesante: Mientras que el extracto floral de febrero presenta una actividad bactericida total desde los primeros tiempos, en el caso del extracto de marzo, se observa una anomalía considerable en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, debido a que, pese a que se obtuvo la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida, dentro del ensayo no se logró la inhibición total de la cepa. Esto se debe a que *S. aureus*, como toda bacteria Gram positiva, presenta características de membrana de alta selectividad, lo que le permite repeler compuestos tóxicos. Si bien es cierto que existe un comportamiento sinérgico entre todos los compuestos del extracto, y que es la causa principal del comportamiento bactericida, se debe tomar en cuenta que la genética de la población bacteriana no es igual (Fernández et al., 2003). *S. aureus* presenta diversos mecanismos de defensa, entre los que se destacan la formación de bombas activas para la expulsión de moléculas antimicrobianas, la disminución de la permeabilidad membranal después de la exposición a un compuesto tóxico y la producción de enzimas inactivantes (Lyobe, 1997; Hart, 1998; Elliot 1999). En el

presente estudio se infiere que el comportamiento bacteriano observado durante la curva de crecimiento en presencia del extracto floral de marzo es diferente debido a que, pese a presentar un alto grado de toxicidad, no es lo suficiente como para inhibir el crecimiento de toda la población bacteriana.

Al evaluar la actividad antifúngica, ambos extractos presentaron actividades muy similares. Al referirse a lo sucedido con los hongos levaduriformes, se puede mencionar que el efecto fue indistinto entre los dos, ya que no se encontraron diferencias significativas ($P=0.05$; $F=3.2891$) a la hora de compararlos. Aunque tienen efectos ligeramente menores a los encontrados en la nistatina, el resultado es prometedor, ya que indica que contiene el efecto equiparable a un compuesto purificado. Por otro lado, la inhibición sobre diferentes cepas de levaduras es de gran relevancia, debido a que las candidiasis (que es el nombre que reciben las infecciones producidas por este tipo de hongos) son enfermedades de gran relevancia médica, ya que suelen ser muy agresivas, especialmente sobre las mucosas, siendo las más conocidas las candidiasis a nivel vaginal y a nivel bucofaríngeo (Dos Anjos, 2012). Dichas infecciones suelen mostrar una gran resistencia al uso de antifúngicos, y aquellos que tienen éxito, por lo general presentan daños colaterales diversos (Araújo et al., 2004). Por esta razón, a la hora en que se detectan extractos, como el caso de los utilizados durante este estudio, se propone la realización de estudios más enfáticos sobre organismos micóticos para identificar el potencial curativo de las plantas de origen de dichos extractos.

Con respecto a la actividad sobre los hongos filamentosos, se observó que los extractos poseen la misma actividad en promedio sobre las cepas utilizadas. Solamente en organismos del género *Tricophyton* hubo una inhibición muy marcada, mientras que en las cepas de *Aspergillus* se observa una ligera tendencia de carácter inhibitorio. El caso de *Tricophyton* resulta importante, ya que se trata del agente causal de la mayoría de las micosis dérmicas en casos clínicos (Ghannoum et al., 2013; Havlickova et al., 2008, Montes-De-Oca-Márquez, 2017). La actividad reportada sobre este hongo utilizando otras especies de la familia Fabaceae son escasos, destacando los trabajos de Pérez et al. (2003), quienes encontraron

actividad antifúngica de un flavonoide aislado de *D. elegans* (2'4'-dihidroxy-5'-(1''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina) y el en trabajo de Montes-De-Oca et al. (2017) quienes, trabajaron con cepas de *Aspergillus niger*, *Fusarium sporotrichum*, *Tricopyton* y *Rhizoctonia lilacina* utilizando diferentes extractos (hexánico, acetónico y metanólico) de tallos y flores de *Dalea carthagenensis* (JACQ.) J. F. MACBR. Con esas cepas, algunas de las cuales fueron utilizadas en el presente trabajo, se obtuvieron actividades antimicóticas mayores (las concentraciones para la CF₅₀ calculadas fueron menores de 2 mg/mL).

Los análisis químicos de los extractos confirman lo anterior, debido a que, como se observa en el Cuadro 9 existe, por lo menos, una diferencia considerablemente alta en las concentraciones de fenoles y flavonoides (0.061 mg eAG/g y 0.488 mg eAG/g en el caso de los primeros y 0.364 mg eQ/g y 23 mg eQ/g para los segundos). Se debe recordar que estos metabolitos secundarios suelen ser el resultado de la respuesta a diferentes estímulos del medio, como es el caso de estrés por sequía, por altas temperaturas o ataques de agentes microbianos o parásitos, y, para las flores, son compuestos vitales, ya que muchos de ellos son los que producen los aromas que atraen a los polinizadores.

Otro grupo de compuestos muy importantes para la actividad antimicrobiana son los alcaloides, cuya presencia ha sido reportada con anterioridad en el género *Prosopis*. Aqeel et al., en 1989, detectaron que en hojas, tallos, corteza y raíces se encuentran los alcaloides conocidos como juliflorina, julifloricina y fracción bencénica insoluble alcaloidal obtenidos por extracciones dirigidas para la obtención de alcaloides en *Prosopis juliflora*; al ser utilizados contra cultivos de *S. aureus* descubrieron una relación dosis-dependiente para la efectividad antimicrobiana. Rhagavendra y colaboradores, en 2009, encontraron que la fracción alcaloidal de *Prosopis juliflora* tuvo una respuesta favorable contra *Alternaria alternata*, un hongo filamentoso que suele atacar a los cultivos de tabaco y que, además, puede llegar a ser nocivo para las personas inmunodeprimidas, afectando especialmente al aparato respiratorio. Sus resultados son equiparables con los obtenidos a lo largo de este estudio, ya que, si bien es cierto que no se utilizó esa cepa, cabe mencionar que hubo una respuesta favorable en la inhibición de otras cepas de hongos filamentosos, con la

clara excepción de *Aspergillus*, que es un género que se distingue por su alta capacidad de proliferación y de adaptación a todo tipo de condiciones ambientales.

Al observar los resultados obtenidos en bacterias, hongos levaduriformes y hongos filamentosos, se decidió realizar una prueba de toxicidad, la cual fue realizada utilizando larvas nauplio de *Artemia salina*, que fueron expuestas a concentraciones de 10, 100 y 1000 partes por millón (ppm). Castro, en 2016, reportó que el extracto floral de febrero presentó una toxicidad muy elevada (la menor concentración utilizada en su ensayo reportó un índice de letalidad del 90%). En el caso del extracto de la colecta de marzo, la letalidad disminuyó ligeramente, teniendo, para la concentración más alta (1000 ppm) , un porcentaje de 90% de letalidad. Esto no significa propiamente que el extracto sea tóxico para el ser humano, sino que muestra una alta actividad contra organismos que presentan poca selectividad en los compuestos que absorben, ya que las larvas nauplio presentan la característica de una filtración no selectiva, por lo que todo lo que hay en su ambiente llega directamente a sus estructuras internas (FAO, 2006). La alta toxicidad de ambos extractos se atribuye a la presencia de alcaloides, debido a que en otros trabajos, como el de Tabosa et al. (2000), se reporta a los alcaloides presentes en el género *Prosopis* presentan una alta toxicidad, especialmente la juliflorina y la julifloricina, a nivel neurológico (Aqeel, 1989; Tabosa et al., 2000).

Al momento de evaluar la actividad antioxidante de los dos extractos, se encontró una notable diferencia en ésta, siendo la más alta la de la colecta de febrero al requerir menor concentración para la reducción del radical DPPH; sin embargo, las concentraciones de la CL₅₀ (591 µg/mL y 907 µg/mL), de acuerdo con el criterio de Al-Fatimi (2007), estos valores corresponden al rango de baja o nula capacidad antioxidante. Aunque este dato pueda parecer contradictorio con las concentraciones de fenoles y flavonoides reportadas para ambos extractos, se debe recordar que, si bien es cierto que este tipo de moléculas son conocidas por estar directamente relacionadas con efectos de neutralización de las especies reactivas del oxígeno, también es cierto que no todas las moléculas fenólicas y polifenólicas presentan actividad antioxidante importante, ya que ésta dependerá del tipo y

arreglo de los grupos funcionales que las adornen,. Se observa que dentro de la composición química de ambos extractos hay un alto porcentaje de pinocembrina, compuesto fenólico común en casi todas las plantas, que presenta, por su conformación molecular, una baja actividad antioxidante, si es comparada con otros compuestos de naturaleza fenólica, como la quercetina (Lien et al., 1999). Destacando su actividad biológica, la cual es esencial para diferentes procesos biológicos, como la defensa ante diferentes tipos de estrés, especialmente el hídrico y el de calor, y ecológicos, resaltando la defensa al ataque de diferentes patógenos, destacando los bacterianos y los fúngicos (Cruz, 2007; Agüero et al., 2010).

Los ácidos fenólicos, que componen un grupo encontrado en la caracterización por HPLC, tienen una gran importancia biológica y médica, que se ha estudiado durante por lo menos los últimos cincuenta años. En el campo biológico, se les atribuyen varias funciones, de las que se destacan la disuasión de depredadores y la defensa contra sustancias alelopáticas, lo que cobra gran significado al considerar que el órgano de la planta utilizado para la obtención de los extractos es la flor, que requiere de una gran cantidad de defensas contra posibles depredadores antes, durante y después de la polinización; otra función importante es la inhibición de la germinación de semillas de otras especies y de esporas fúngicas (Harbone, 1994). Adicionalmente, se ha observado que participan en diversos mecanismos de protección de las plantas contra fitopatógenos, por medio de la inhibición o activación de enzimas como pectinasas, amilasas vegetales, fenoloxidasa, succinato-deshidrogenasa, RNAsa pancreática, y la activación de las enzimas que participan en la germinación de especies de interés como lo son la cebada y el frijol mungo (Goodman et al, 1986; Van Sumere et al, 1975). Aunado a esto, algunos ejercen un efecto de desacoplamiento en mitocondrias de levaduras y ratas, además de tener un fuerte efecto en la fotofosforilación (Van Sumere et al., 1975), lo que los convierte en candidatos para explicar el efecto sobre cándidas, ya que intervienen dentro de la cadena de transporte de electrones, impidiendo que ésta se lleve a cabo adecuadamente y, por tanto, inactivando la mitocondria.

En el caso de los fenilpropanoides, cuya frecuencia es mayor dentro del extracto de la colecta de febrero, se puede comentar que esta familia química tiene una gran importancia biológica para las plantas que los producen, ya que su síntesis únicamente ocurre cuando se encuentran bajo diferentes factores de estrés (Rhodes, 1985), Siendo su función principal la de evitar el crecimiento bacteriano (Surico et al., 1987). Además, se ha demostrado que algunos miembros de este grupo químico presentan otras funciones farmacológicas de interés, como efecto analgésico, hipotensivo, decrecimiento de las neuropatías en diabéticos, y efecto anti alergénico y antiinflamatorio (Andary et al., 1980, Cooper et al, 1980, Kimura et al., 1987). Sin embargo, se debe tener en cuenta que hay otros que han sido reportados como agentes causales de dermatitis, daño hepático y carcinogénesis (Murray et al., 1982; Brown, 1985), efectos que podrían estar relacionados directamente con la alta toxicidad de ambos extractos detectada en la prueba sobre *Artemia salina*.

Aunque no se ha establecido una función universal para las flavonas y los flavonoles, se debe decir que son los flavonoides más comunes en los extractos vegetales (Harborne, 1989). Sin embargo, las funciones que se les han atribuido son la protección de las plantas contra la radiación UV y el ataque de insectos hongos, virus y bacterias; participan como agentes atrayentes de polinizadores; se ha reportado una buena capacidad antioxidante, además de un efecto inhibidor de enzimas y funcionan como agentes alelopáticos (McClure, 1975). En el presente trabajo, la presencia de flavonoles es básica al tratarse de extractos florales; sin embargo, lo que llama la atención en el perfil químico de ambos extractos es la baja capacidad antioxidante de los dos, lo que se puede explicar por altas concentraciones de compuestos polifenólicos que tienen una estructura poco reactiva, lo que disminuye considerablemente la capacidad antioxidante de cada extracto, siendo posible que los flavonoles presentes tengan una fuerte actividad dentro de la atracción de polinizadores.

El listado de compuestos detectados revela la enorme diferencia en la producción de metabolitos secundarios realizados por una misma especie si ésta se encuentra

sometida a diferentes presiones ambientales. Así, por medio de GC-MS y de HPLC-MS, se encontró una composición diferente entre ambas colectas.

Los compuestos encontrados por Castro (2016) a partir del estudio de la composición mediante HPLC-MS en el extracto de la colecta de febrero fueron vainillina, que posee propiedades antidrepanocíticas, antimutagénicas, antineoplásicas, antioxidantes, neurodepresivas y antiinflamatorias (Trapero, 2013); ácido cafeíco, que ha presentado actividad antioxidante, además de ejercer efectos de tipo quelante y modular la actividad de varios sistemas enzimáticos (Gutiérrez, 2002); acacetina, que ha sido reportada con propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas (Reynaldo et al., 2001; Carballo-Villalobos et al., 2014; Zhao et al., 2014) e inhibición de células tumorales (Lee et al., 2014; Jung et al., 2014); y crisina, que ha sido reportada como una molécula con una alta capacidad antioxidante y propiedades ansiolíticas sobre el sistema nervioso central (Jeong et al., 1999; Paladini et al., 1999; Reynaldo et al., 2001). En el caso de la colecta de marzo, los principales compuestos detectados fueron pinocembrina, que ha reportado una alta citotoxicidad en pruebas con *Artemia salina* y en la línea celular 9-PS (Jung et al., 1990), y un alto efecto antifúngico, especialmente contra hongos filamentosos (Agüero et al., 2010); apigenina, que se ha reportado como un agente antibacteriano efectivo contra *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Basile y colaboradores, 1999); Naringenina, que ha sido reportada como un metabolito con una importante actividad antibacteriana (Rahua et al., 2000); Kaempferol, que ha sido reportado como antiinflamatorio, antioxidante, antibacteriano y antifúngico (Ho et al., 2011; Tatsimo et al., 2012); y quercetina, la cual, como se ha mencionado antes, se ha reportado con importantes actividades biológicas, destacando la actividad antioxidante y antimicrobiana, así como un nivel importante de citotoxicidad (Lien et al., 1999; Rahua et al., 2000; Cruz, 2007; Agüero et al., 2010). Aunque es notoria la diferencia entre los dos esto se puede deber a las condiciones climáticas de la recolección, ya que de acuerdo a las condiciones ambientales y los tipos de estrés a los que estén expuestos los organismos vegetales promoverán la producción, sobreproducción o inhibición de algunos

metabolitos secundarios, como mecanismo de supervivencia (López, 1984; Hertog et al., 1993; Tsuchiya et al., 1996; Delatorre et al., 2008).

Conclusiones

- El rendimiento de los extractos fue diferente, siendo mayor el rendimiento de la colecta de marzo que en la colecta de febrero.
- El extracto de marzo mostró mayor actividad antimicrobiana que el de febrero.
- Ambos extractos son bactericidas para *Vibrio cholerae*, pero sólo el extracto de la colecta de febrero resultó bactericida para *Staphylococcus aureus*
- No se encontraron diferencias significativas en la actividad de ambos extractos frente a hongos levaduriformes
- El extracto de la colecta de marzo, al probarse en hongos filamentosos, presentó una actividad promedio significativamente mayor que la registrada en el extracto de la colecta de febrero.
- El extracto de febrero resultó ser más tóxico.
- Ambos extractos presentaron una baja capacidad antioxidante.
- El extracto de la colecta de marzo el que presentó una mayor concentración de fenoles, flavonoides y alcaloides.
- La composición química de ambos extractos fue diferente presentando como compuestos mayoritarios acacetina, crisina, ácido caféico y vainillina en el extracto de febrero y pinocembrina, pigenina, naringenina, kaemperol y quercetina en el extracto de marzo.

Apéndices

Apéndice 1

Descripción botánica (Cervantes y Concepción, 2002; Flores, 1993)

Prosopis laevigata (Humb. Et Bonpl. Ex Wild) M.C Johnst

Taxonomía

Nombre común: Mezquite, mimosa, Acacia

Reino: *Plantae*

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Subclase: *Rosidae*

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosideae

Género: *Prosopis*

Especie: *Prosopis laevigata* (Humb. Et Bonpl. Ex Wild) M.C Johnst

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

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

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



Inflorescencia de *P. laevigata*

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

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

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

Semilla: Es de forma oblonga o aplastada, dura; su color varía de café claro a oscuro. La diseminación de las semillas es zoófila y endozoica, es decir, por medio del tracto digestivo de animales (CONAZA e INE, 2000)

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

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

Condiciones edáficas: El mezquite se establece en una amplia gama de tipos de suelo; sin embargo, crecen con mayor vigor en los suelos profundos, como en las

partes bajas de los valles, mientras que su altura es menor en las laderas de los cerros o suelos delgados. Prosperan en suelos arenosos, así como en los arcillosos-arenosos, pueden tolerar un alto contenido de sales o mal drenaje en el suelo. Los tipos de suelo donde crece son sierozem y chesnut, ya que son característicos de los lugares donde se encuentra distribuido el mezquite en nuestro país.

El mezquite tiene un amplio rango de distribución, se le encuentra hasta 2300 m snm.

Apéndice 2

Zona de colecta

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

Clima

El clima es de tipo Bs (h')w''(w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22°C, variando entre 25° en abril y mayo y 18°C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona.

Hidrografía

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

Edafología

En origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos se caracterizan por estar poco desarrollados y se dividen en dos tipos: regosoles (principalmente calcáreos y regosoles éutricos) y xerosoles (con una predominancia marcada de los xerosoles háplicos).

Vegetación

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

Fernández (1999) reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael:

- a) Cordonal de *Pachycerus weberi* (J. Coutler) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones principalmente).
- b) Chiotillal de *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber) Rose en el nivel más próximo al cauce del río, sobre niveles de 0.0 a 1.5 m por encima del nivel basal de la región, con alta densidad arbustiva.
- c) Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueria Formosa* (Kunth), y arbustos y hierbas como *Sanvitalia fruticosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.
- d) Fouquería con especies de dominantes como *Fouqueria formosa* (Kunth), *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha* (Brandege), *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Mimosa Luisiana* (Brandege), y *Sanvitalia fruticosa* (Helms); localizada en el nivel más alto, de 3.5-5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fruticosa* (Helms).

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales, 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias que abarcan el mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Población

La comunidad de San Rafael es relativamente reciente. Fue fundada a principios del siglo XX y en 2001 contaba con 298 habitantes (151 hombres y 147mujeres) (Anónimo, 2001). Actualmente no se cuenta con estudios demográficos. La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más relevante es la agricultura, siendo el cultivo de la caña de azúcar el que cuenta con mayor importancia. Otras actividades realizadas en la comunidad es la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

Apéndice 3

Método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945) para bacterias; Método de difusión para levaduras (CLSI, 2012); y técnica de inhibición del crecimiento radial en hongos filamentosos (Wang y Bun, 2002)

Esta técnica es utilizada para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto puro o de los compuestos de un extracto, los cuales se difunden a través del agar desde el disco de papel. El crecimiento de la cepa estudiada comienza y los compuestos se alejan del disco de acuerdo a un gradiente de dilución, de modo que a mayor distancia del disco, se tendrá una menor concentración del compuesto o extracto probado, formándose un halo de inhibición circular donde la sustancia no alcanza a inhibir el crecimiento y cuyo diámetro es proporcional a la potencia de la sustancia frente a la cepa.

Medio

Para el ensayo con bacterias se prepara el medio de cultivo Müller-Hinton, ya que es el medio ideal para promover el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos de interés clínico. En el caso de hongos filamentosos y levaduras, el medio utilizado es el medio PDA (agar papa-dextrosa), ya que éste medio promueve con eficacia el crecimiento de la mayoría de las cepas fúngicas de interés médico.

El ensayo se realiza en cajas de Petri, donde el medio debe alcanzar un espesor uniforme de 4 mm; de ser más fino, los compuestos analizados tenderán a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; si es más grueso, el medio provoca que la disolución se precipite, disminuyendo en diámetro del halo de inhibición.

Una vez vertido el medio de cultivo, las cajas se dejan incubando durante 24 horas, esto con la finalidad de verificar la ausencia de contaminación en el agar.

Preparación del inóculo

I. Bacteriano

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müller-Hinton. Hay que enjuagar muy bien el asa para que el material bacteriano quede perfectamente disuelto en el caldo. Una vez hecho esto, se retira el asa y el tubo con el cultivo se incuba a 37°C durante un periodo de 18 a 24 horas o hasta que alcance una turbidez equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland, el cual equivale a una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL.

II. Fúngico (levaduras)

Se sigue el mismo procedimiento que para un inóculo bacteriano, con la diferencia de que se utiliza caldo Saboreaud y se coloca el tubo de cultivo en las mismas condiciones durante 48 horas.

III. Fúngico (hongos filamentosos)

Para la obtención del inóculo de hongos filamentosos, se utiliza un cultivo previamente preparado. Con excepción de géneros como *Aspergillus*, que tienen a soltar una gran cantidad de esporas, se realiza una perforación en el cultivo con la parte posterior de una pipeta Pasteur, obteniendo un botón de siembra de 5 mm de diámetro. Posteriormente, con una aguja de disección o pinzas estériles, se extrae el botón y se coloca en la placa donde se realizará el ensayo, cuidando que la parte con el hongo quede directamente sobre el medio de cultivo.

Para el caso de los hongos con una alta concentración de esporas (como el género *Aspergillus*), Se toma con la punta de una aguja de disección estéril las esporas del cultivo y se pasan al medio del ensayo, procurando dejarlas en el centro de la placa.

III. Inóculo

Se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión de la cepa con la que se vaya a trabajar; antes de retirarlo del tubo, se elimina el exceso de líquido rotando el hisopo contra las paredes internas del tubo.

Posteriormente, se inocula la superficie de la placa con el medio adecuado (Müller-Hinton en el caso de bacterias y PDA para levaduras), sembrando por medio de estría por lo menos en tres direcciones, girando 60° al momento de cambiar de dirección.

Preparación de sensidiscos

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos con papel Whatman del No. 5, en los cuales se aplicará la sustancia a evaluar.

Extracto o fracción activa

Se preparan las diluciones necesarias utilizando como vehículo metanol

Para bacterias, la cantidad de extracto o fracción debe ser de 2 mg; en el caso de hongos filamentosos y levaduras, la concentración mínima requerida es de 4 mg.

Control negativo

Se colocan en los sensidiscos destinados a tal fin 10 µL del solvente utilizado para las muestras problema.

Control positivo

Para cepas bacterianas, se utilizan sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol; para levaduras, se preparan sensidiscos impregnados con 25 µg de Nistatina y para Hongos filamentosos sensidiscos con 25 µg de Ketoconazol. Los discos se deben realizar 12 horas antes del ensayo con la finalidad de que se evapore el solvente.

Prueba de susceptibilidad

Los discos son colocados manualmente en la superficie del agar utilizando pinzas estériles. Se deben dejar a una distancia adecuada unos de otros y abarcando la totalidad de la placa.

Una vez preparadas todas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en incubadora a 36°C sin mayor tensión de CO₂, esto último, para evitar la acidificación del medio y la obtención de falsos positivos o negativos en la prueba.

Interpretación de resultados

I. Bacterias y levaduras

En el caso de existir inhibición, se reporta el extracto o fracción como activa. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración y en milímetros; la prueba debe hacerse mínimamente por triplicado y se reportan los promedios de los resultados por cepa utilizada.

II. Hongos filamentosos

La inhibición se considerará de acuerdo al grado de distorsión de la circularidad del crecimiento del micelio y solamente se reportará como alto (++), bajo (+) y nulo (/).

Apéndice 4

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985)

Esta técnica se utiliza para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) en el caso de levaduras.

Medio

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

Inóculo

Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260). El tubo se incubará por 24 horas a una temperatura de 36°C, obteniendo una concentración aproximada de 1×10^8 organismos/mL. Posterior a esto, se realiza una nueva dilución para obtener una concentración de 1×10^5 organismos/mL. Una vez realizado lo anterior, se colocan 50 µL de las suspensiones diluidas en cada uno de los pozos de la placa de ELISA.

Control negativo

Se colocan 50 µL de caldo Müller-Hinton con el solvente empleado para disolver el extracto a analizar.

Testigo

Se prepara colocando 50 μ L de caldo Müller-Hinton en las concavidades y se agregan 50 μ L de cultivo bacteriano.

Incubación

Una vez que se tiene la placa con la carga bacteriana, se cubre con una tapa para evitar el desecamiento y se incuba a 36°C durante 24 horas.

Interpretación de los resultados

Después del tiempo de incubación, se añade a cada concavidad 50 μ L de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidasa (TTC), para después incubarla durante 30 minutos.

El las concavidades donde haya habido desarrollo de organismos, el colorante será reducido a formazán, el cual produce una coloración rojiza-violácea en el fondo de la concavidad. De no haber desarrollo, la concavidad se mantendrá clara.

Nota: Es importante tener la placa protegida de la luz para evitar resultados falseados.

La concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es aquella en la que se presenta una disminución drástica del crecimiento bacteriano, en tanto que la Concentración Bactericida Mínima será en la que hay una inhibición completa del desarrollo de la cepa.

Esta prueba debe hacerse por triplicado a fin de que tenga resultados estadísticamente significativos.

Apéndice 5

Actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano (Muroi et al., 1993)

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

Medio de cultivo

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

Inóculo

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

La concentración final será se 1×10^5 bacterias/mL en cada tubo. Todos los tubos se incubarán a 35°C sin presión de CO₂.

Tubos con extracto

Se prepara en tubos con agar Müeller-Hinton con las concentraciones de CMI y sus múltiplos medios, es decir, la mitad del CMI, (1/2CMI) y CBM.

Se muestrea cada hora durante los primeros cuatro tiempos: T₀-0, T₁-1, T₂-2, T₃-3, T₄-4 (Tiempo-horas transcurridas), después dos muestreos cada dos horas, uno a las 12 horas y otro a las 24 horas.

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

Testigo

Se prepara un tubo sin extracto como testigo.

Incubación

Las cajas se incuban durante 24 horas a 36°C.

Interpretación de resultados

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

Apéndice 6

Prueba para la obtención de CF₅₀ en Hongos filamentosos (Wang y Bun, 2002; Wang y Ng, 2007)

Este método se utiliza para el cálculo de la Concentración Media Fungicida (CF₅₀) En hongos filamentosos.

Medio de cultivo

Alícuotas de agar PDA adicionadas con las concentraciones del extracto o compuesto puro a probar colocadas en cajas plásticas con 24 concavidades, donde se colocaron por triplicado las alícuotas con las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 8.0 mg/mL. En otros tres pozos, se colocó agar sin el compuesto o extracto a probar, que constituirán el grupo testigo.

Inóculo

Se realizan perforaciones en un cultivo previamente desarrollado con la punta de pipetas Pasteur estériles, para obtener botones de 1mm de diámetro. Con ayuda de una aguja de disección o pinzas, se toman los botones obtenidos de dichas perforaciones y se colocan en el centro de cada pozo con el agar PDA previamente vertido y solidificado.

Nota: En el caso de hongos con un alta de producción de esporas, como las especies del género *Aspergillus*, solo se toma una pequeña porción de esporas con la punta de una aguja de disección y se colocan en el centro de los pozos de la caja plástica.

Incubación

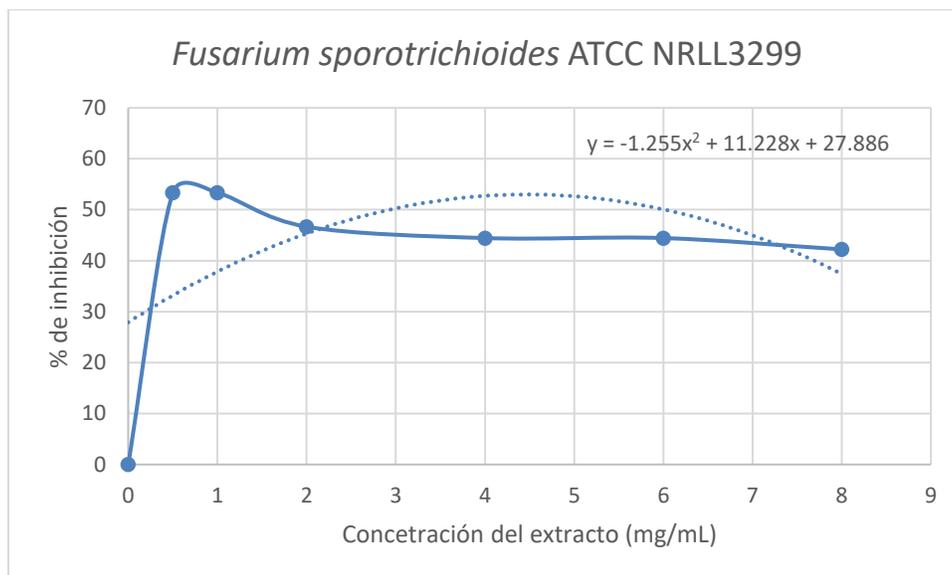
Las cajas se dejarán a temperatura ambiente y se revisarán periódicamente hasta el momento en que los testigos hayan abarcado la superficie total de sus respectivos pozos.

Interpretación de resultados

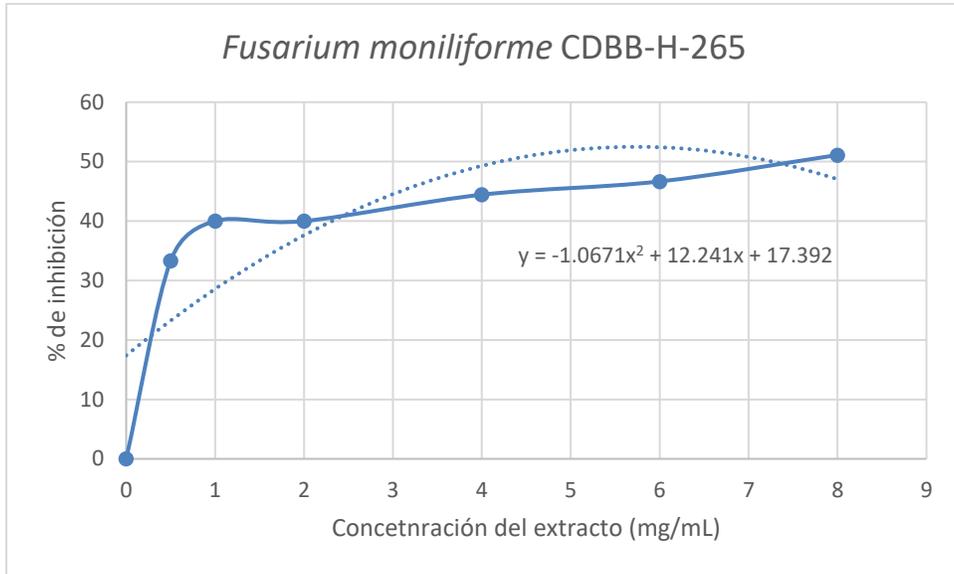
Se realizan mediciones del diámetro del crecimiento radial en cada pozo y se saca el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de hongo filamentoso}}{\text{Diámetro del pozo}} \times 100$$

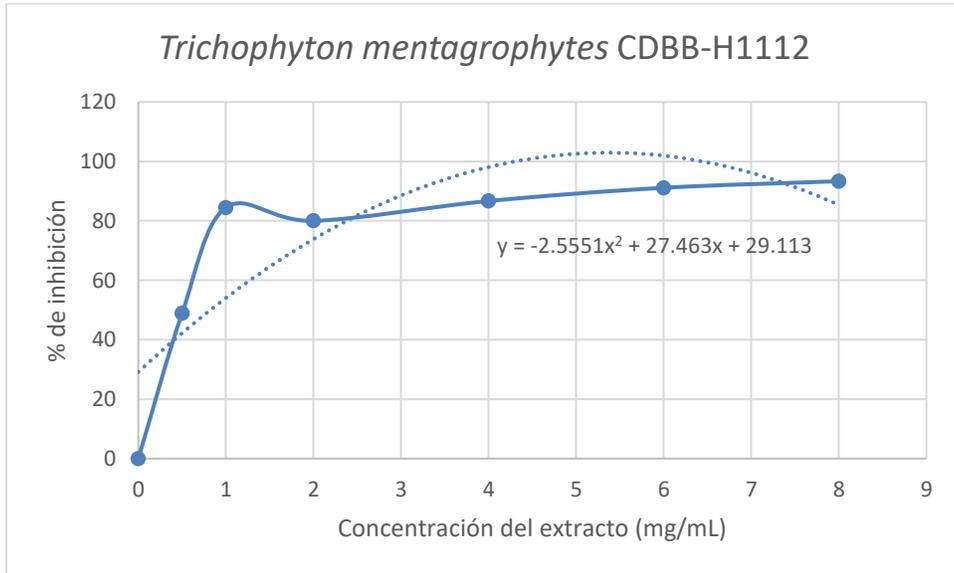
Una vez obtenidos los resultados, se sacan promedios de cada concentración y se grafican, para, posteriormente, calcular la CF_{50} .



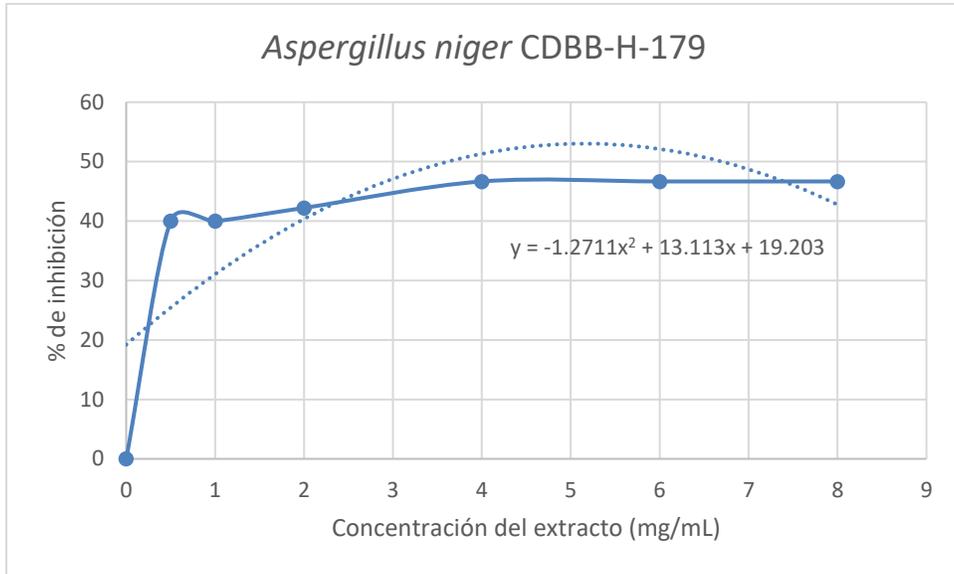
Gráfica para *F. sporotrichioides* ATCC NRLL3299 con el extracto de febrero.



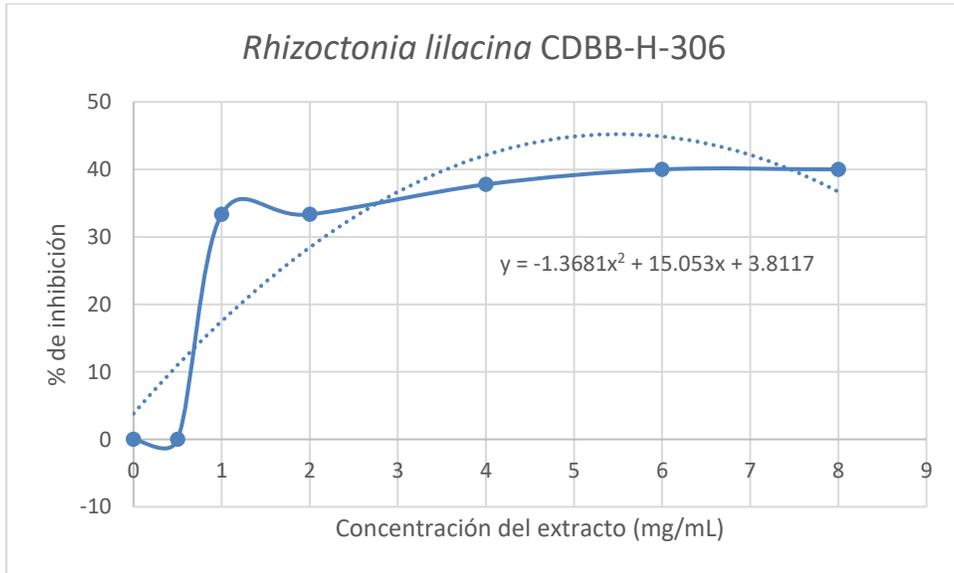
Gráfica para *F. moniliforme* CDBB-H-265 con el extracto de febrero.



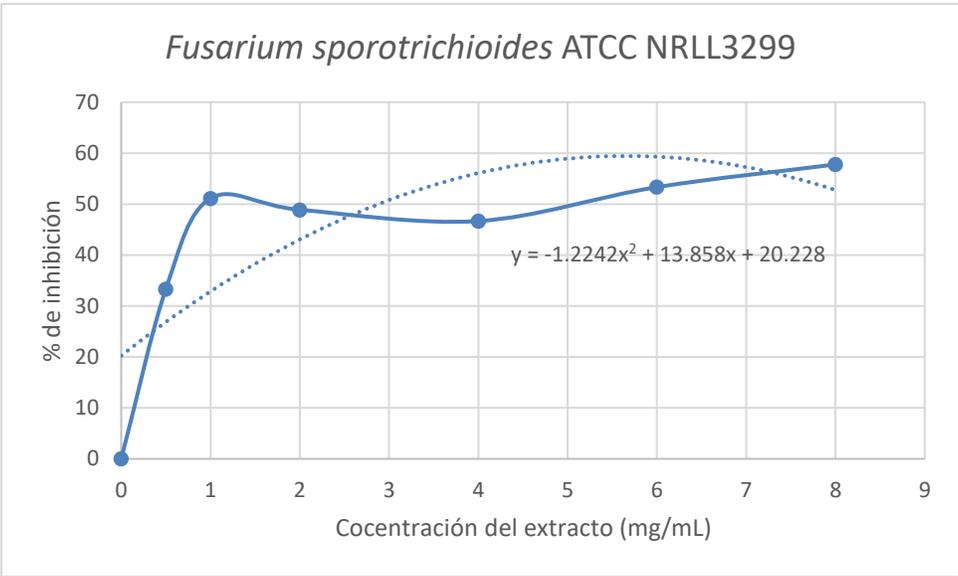
Gráfica para *T. mentagrophytes* CDBB-H1112 con el extracto de febrero.



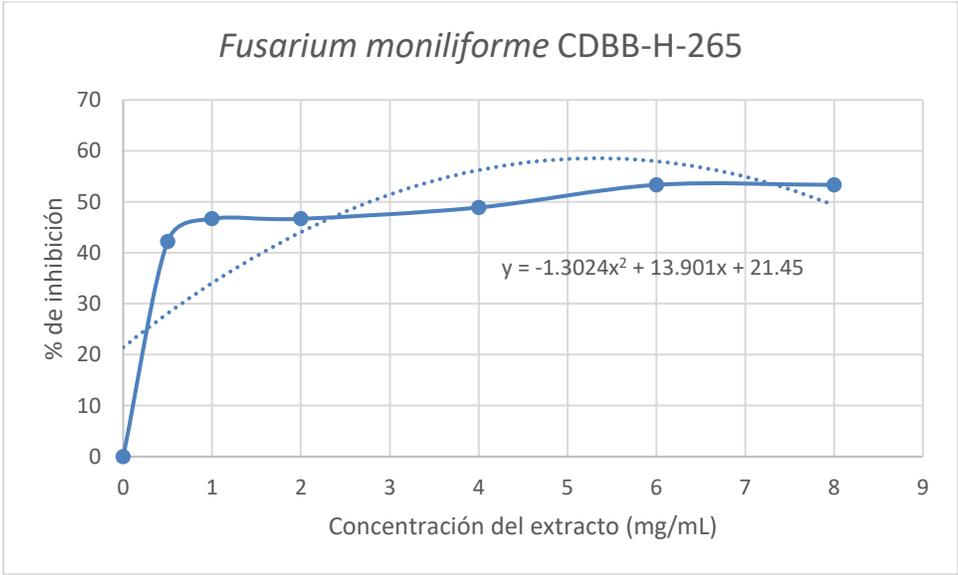
Gráfica para *A. niger* CDBB-H-179 con el extracto de febrero.



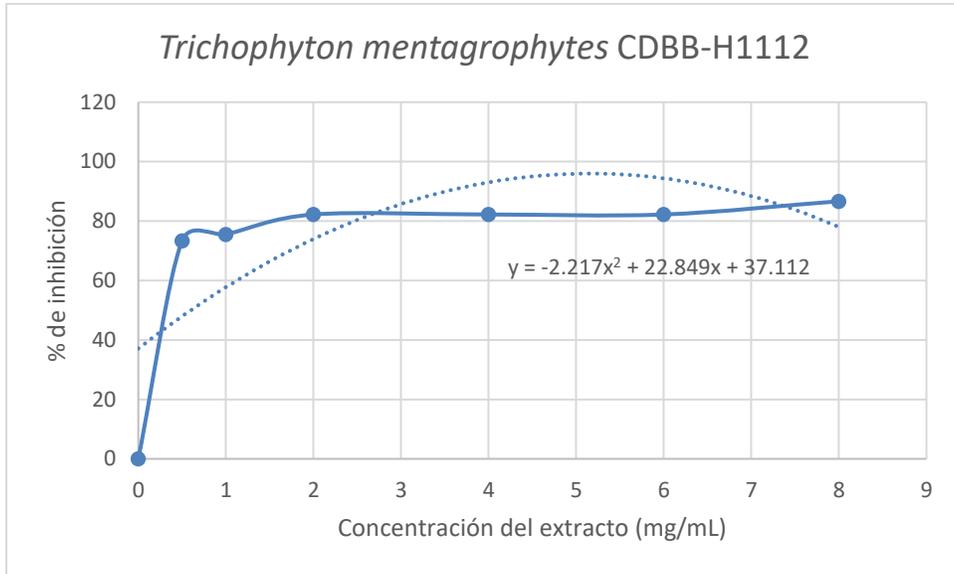
Gráfica para *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306 con el extracto de febrero.



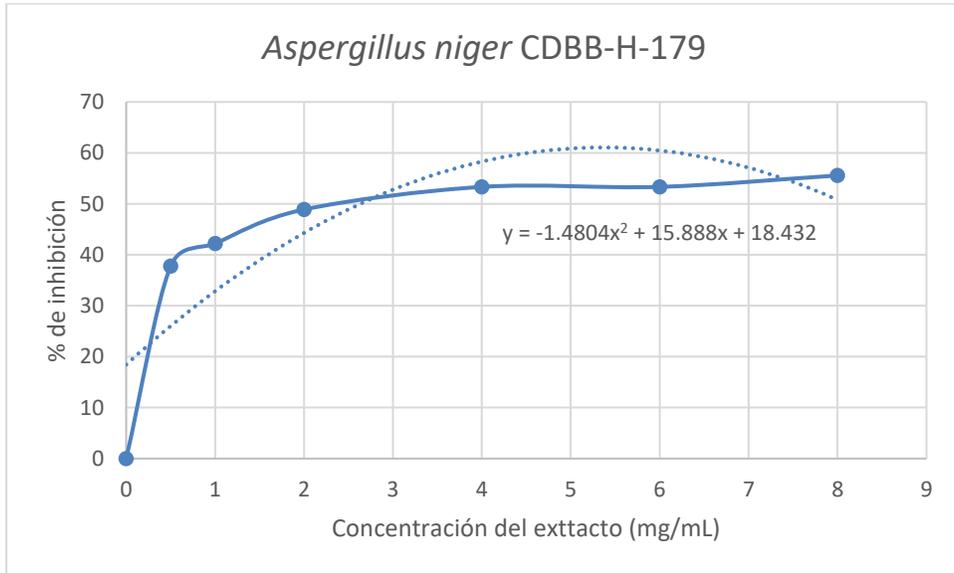
Gráfica para *F. sporotrichioides* ATCC NRLL3299 con el extracto de marzo.



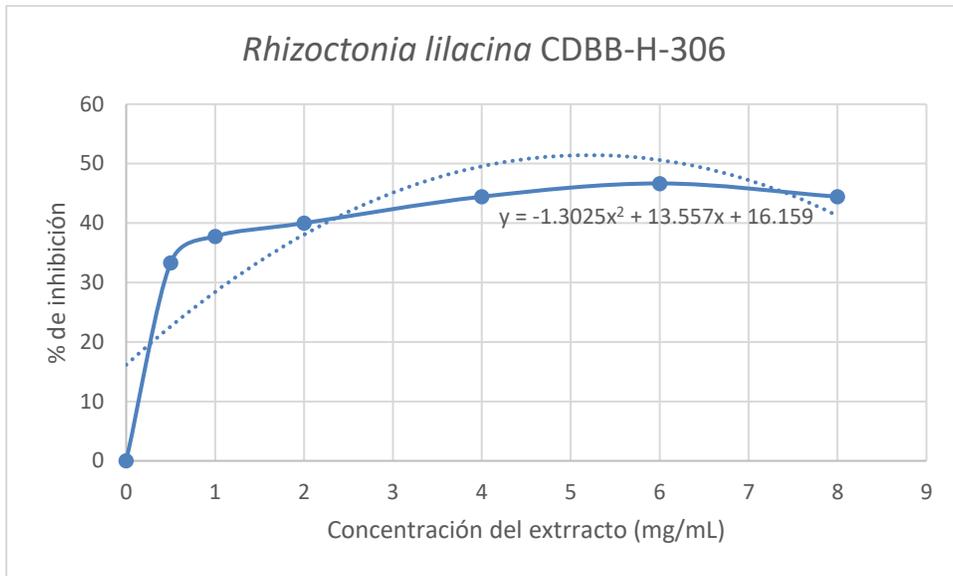
Gráfica para *F. moniliforme* CDBB-H-265 con el extracto de marzo.



Gráfica para *T. mentagrophytes* CDBB-H1112 con el extracto de marzo.



Gráfica para *Aspergillus niger* CDBB-H-179 con el extracto de marzo.



Gráfica para *R. lilacina* CDBB-H-306 con el extracto de marzipan.

Apéndice 7

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

El ensayo se realiza con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach).

Eclosión de las larvas

Se prepara una solución para un litro en la que se agregan 5 g de NaCl y 2 g de NaHCO₃; una vez teniendo esta solución, se agregan 0.5g de quiste de *A.salina*.

Los quistes se incuban en estas condiciones de 24 a 48 horas con buena oxigenación, a una temperatura aproximada de 25°C y con iluminación artificial (luz blanca).

Preparación de los tratamientos

En frascos viales transparentes se colocan 10 mL de agua de mar y se colocan 10 larvas en cada uno.

Las concentraciones del problema utilizadas son 125 mg/mL, 12.5 mg/mL y 1.25 mg/mL (correspondientes a 1000, 100 y 10 partes por millón (ppm)).

Control negativo

Se utiliza el solvente utilizado con el extracto problema, empleando el mismo volumen en que se disolvió la concentración más alta del extracto a evaluar (500 µL).

Control positivo

Se utiliza ácido gálico en las concentraciones de 125 mg/mL, 12.5 mg/mL y 1.25 mg/mL (correspondientes a 1000, 100 y 10 partes por millón (ppm)).

Testigo

Se colocan únicamente las larvas en 10 mL de la solución de agua de mar.

Incubación

Los cultivos se deben mantener iluminados (con luz blanca) a una temperatura de 23-25°C durante 24 horas.

Interpretación de los resultados

Se cuenta el número de larvas supervivientes.

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

La actividad tóxica general se considera débil cuando la CL₅₀ está entre los 500 y los 1000 ppm y fuerte cuando está por debajo de las 100 ppm.

La forma de determinar el porcentaje de mortalidad dentro de la prueba es a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{letalidad} = (IM/IV) * 100$$

Dónde: IM= Individuos muertos; IV= Individuos vivos.

Con el resultado, se clasifica el extracto problema según el Criterio del Programa de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED) (Pinzón et al., 1995).

Categoría	Criterio de Letalidad	µg/mL
I	Extremadamente tóxico	1-10
II	Altamente tóxico	10-100
III	Moderadamente tóxico	100-500
IV	Ligeramente tóxico	500-1000
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

Clasificación de toxicidad según el CYTED

Apéndice 8

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

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

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que es una pequeña molécula que, debido, a su estabilidad y estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo hidroxilo (García, 2007).

Curva de calibración

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

Preparación del extracto

Se prepara una solución estándar (200 μ g/mL) de la cual se toma una alícuota de 250 μ L y se agregan 750 μ L de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Se toma 1 mL de cada concentración y se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada; a continuación, se adicionan 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu.

Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL. La mezcla resultante se deja reposar

durante dos horas, tiempo en el cual todos sus componentes reaccionan a temperatura ambiente, y se lee la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se lee por triplicado.

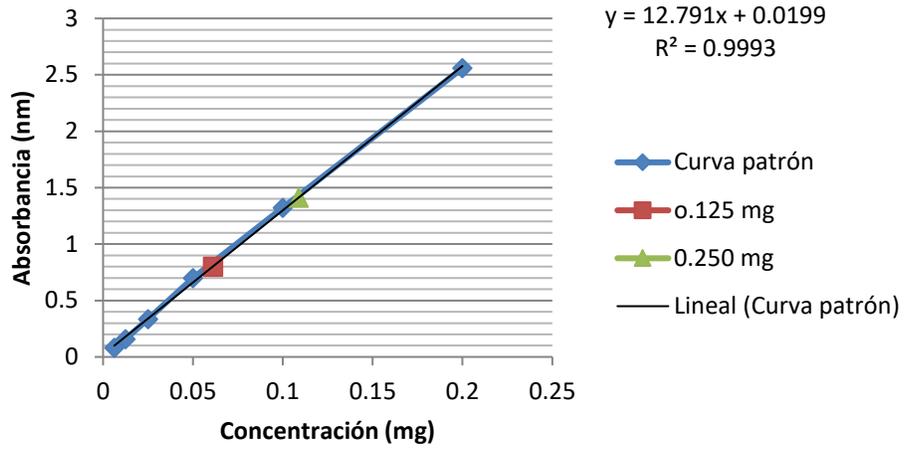
Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón (ácido gálico μ L)	Agua destilada (μ L)	Agua destilada (mL)	Folin-Ciocalteau (μ L)	Na ₂ CO ₃ (mL)
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25	968.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.0250	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
Problema	-----	250	750	7	500	1.5
Problema	-----	500	500	7	500	1.5

Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener una curva patrón de ácido gálico. Para conocer la concentración de fenoles del extracto problema, se utiliza un análisis de regresión lineal, interpolando la absorbancia de las muestras evaluadas.

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

Fenoles totales



Apéndice 9

Contenido de flavonoides totales Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)

Este método se basa en el viraje de color de una solución de AlCl_3 a color amarillo por la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4 y , o bien el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, así como la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides (Kalita et al, 2013).

Stock de quercetina

Se pesan 3 mg de quercetina, los cuales e disuelven en 3 mL de MeOH grado HPLC.

Curva patrón

Se toman alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm y se les agrega 1mL de AlCl_3 al 2%.

Nota: Para las primeras concentraciones (de 1 a 5 ppm), hacer lo siguiente:

Del stock de quercetina tomar 20 μL y agregar 180 μL de MeOH, teniendo un volumen final de 200 μL . De este nuevo stock, se toma:

[] ppm	μL stock de quercetina	μL de MeOH	AlCl_3 al 2%
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

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

[] ppm	μL stock de quercetina	μL de MeOH	AlCl_3 al 2%
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

Stock del extracto

Se pesan 3mg del extracto etanólico y se disuelven en 3 mL de MeOH grado HPLC

Blanco

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

Problema

Se toma 1 mL del stock del extracto y se le agrega 1 mL de AlCl_3 al 2%.

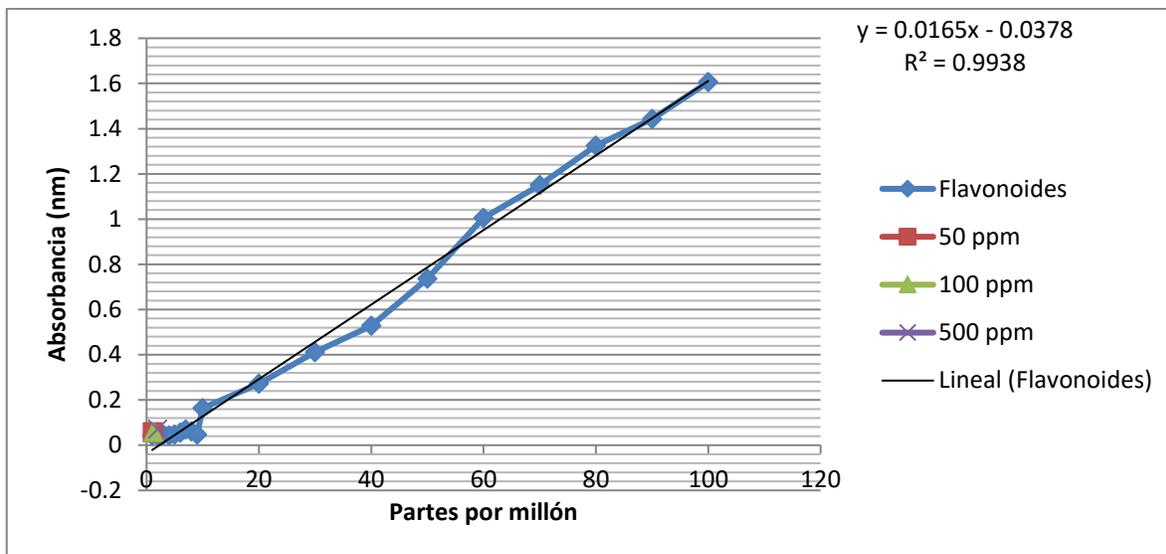
Se vierten 200 μL de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA, por triplicado.

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

Interpretación de resultados

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

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



Apéndice 10

Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•) (Okusa et al, 2007)

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

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

Solución DPPH

Se prepara en un matraz aforado, colocando 0.00197g (0.002g) y 50 mL de MeOH grado HPLC.

Stock del extracto

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

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

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

Del stock (5 mg en 5 mL de MeOH) se toman 20 µL (que llevarán 20 µg) y se adicionan 180 µL de MeOH para tener un volumen fina de 200 µL. De este nuevo stock se tomarán las siguientes cantidades:

[] ppm	μL stock	μL de MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960

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

[] ppm	μL stock	μL de MeOH
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750
300	300	700
400	400	600
500	500	500
600	600	400
700	700	300

800	800	200
900	900	100
1000	1000	0

Aplicación de sustancias

En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-1000 ppm) por triplicado, para agregar posteriormente 150 µL de la solución metanólica de DPPH. Inmediatamente se protege de la luz envolviéndola con papel aluminio y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Luego de incubar, se determina la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA.

Blanco

Se llenan pozos con 200 µL de metanol.

Interpretación de resultados

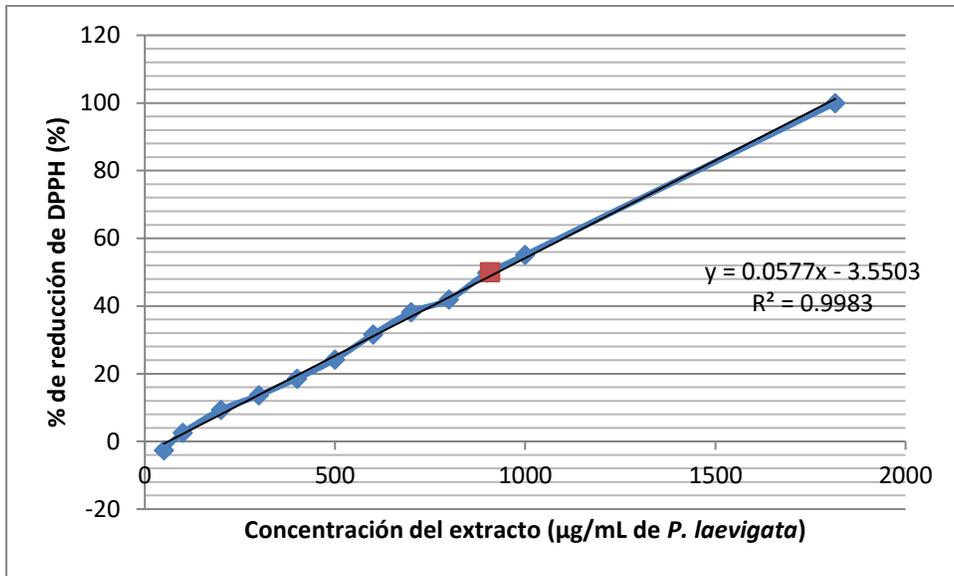
Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción, que se calcula con la siguiente fórmula:

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

En donde:

C=Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH

E= Absorbancia experimental (Mezcla de DPPH (150 µL) + solución problema (50µL)).



Capacidad antioxidante del extracto metanólico por reducción de DPPH

Apéndice 11

Detección cualitativa de alcaloides

Las dos técnicas de detección cualitativa de alcaloides se basan en la capacidad de los alcaloides para combinarse con yodo y metales pesados como el bismuto, mercurio y tungsteno, formando precipitados visibles. Estos ensayos preliminares se pueden realizar en campo o laboratorio.

I. Dragendorff

Es una de las técnicas más utilizadas para la detección de alcaloides. Se utiliza el reactivo de Dragenforff.

Primero, se disuelve la muestra problema con ácido clorhídrico al 5% para posteriormente filtrar y agregar el reactivo de Dragendorff (que es tetrayodo bismuto de potasio). En caso de formarse un precipitado rojo-naranja, se confirma la presencia de alcaloides en la muestra.

II. Mayer

Esta técnica también es muy usada para la detección de alcaloides y se puede utilizar para confirmar los resultados obtenidos con el reactivo de Dragendorff.

Se realiza exactamente el mismo procedimiento que en la técnica de Dragendorff, solo que agregando el reactivo de Meyer, que se compone de cloruro de mercurio y potasio. En este caso, la prueba se declara positiva si se obtiene un precipitado de color blanco o amarillo claro.

Apéndice 12

Cuantificación de Alcaloides (Shamsa et al., 2008)

Se recomienda utilizar esta técnica en caso de detectar alcaloides en la muestra con la que se está trabajando.

Se basa, por un lado, en la reacción del verde de bromocresol, el colorante utilizado dentro de la técnica, para estabilizarse al momento de encontrarse en un medio ácido (entre 4 y 5 en la escala de pH). Cuando se encuentra en un medio de esa naturaleza, se torna azul al desprotonarse, se vuelve amarillo en el momento en que cae en un medio ácido. Por otro lado, la precipitación de los alcaloides en medios ácidos es muy importante, debido a que en el momento en que se encuentran en un medio ácido, tienden a precipitarse (este es el mismo fundamento que las técnicas de detección cualitativa). Dentro de esta técnica, ambos principios se unen, ya que a la hora de hacer lavados con cloroformo, este solvente es capaz de arrastrar los alcaloides acidificados, coloreados con el verde de bromocresol que, al caer en un medio ácido (es decir, el cloroformo con los alcaloides) se torna amarillento, siendo esto lo que se mide por espectrometría.

Preparación de reactivos

I. Verde de bromocresol

Se pesan 69.8 mg de verde de bromocresol, los cuales se disuelven en 3 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2 N. Una vez disuelto el colorante, se añaden otros 5 mL de agua destilada.

Es necesario calentar un poco la mezcla con la finalidad de disolver bien el azul de bromocresol. Una vez disuelto perfectamente, se afora a un litro añadiendo agua destilada.

II. Buffer de fosfato (pH 4.7)

Para el buffer se requiere una solución 2 M de fosfato de sodio, la cual se prepara pesando 21.6 gramos de Na_2HPO_4 y se disuelven en un litro de agua destilada.

Para ajustar el pH a 4.7 se utiliza una solución de ácido cítrico en las proporciones de 42.02 g para un litro de solución. Con ayuda de un potenciómetro, se ajusta el pH de la solución hasta llegar a 4.7

Nota: En caso de observarse poca variación al añadir gotas de ácido cítrico, preparar una nueva solución más concentrada.

III. Estándar de atropina

Para realizar la curva patrón, se hace un stock de atropina en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de agua destilada.

IV. Stock del problema

En el caso del problema, se prepara un stock con la concentración de 2 mg/mL de agua destilada.

V. Preparación de la curva

Una vez que se han preparado los stocks de atropina y del problema, se procede a colocar en tubos de ensayo las siguientes cantidades:

mL de stock	Atropina (mg)	Buffer fosfato (4.7 pH) mL	Verde de bromocresol mL
0.2	0.02	2.5	2.5
0.3	0.03	2.5	2.5
0.4	0.04	2.5	2.5
0.5	0.05	2.5	2.5
0.6	0.06	2.5	2.5
0.8	0.08	2.5	2.5
1.0	0.1	2.5	2.5

En el caso del problema, se toma una alícuota de 1.2 mL, que llevará una concentración de 2.5 mg del extracto.

*Lavados de cloroformo

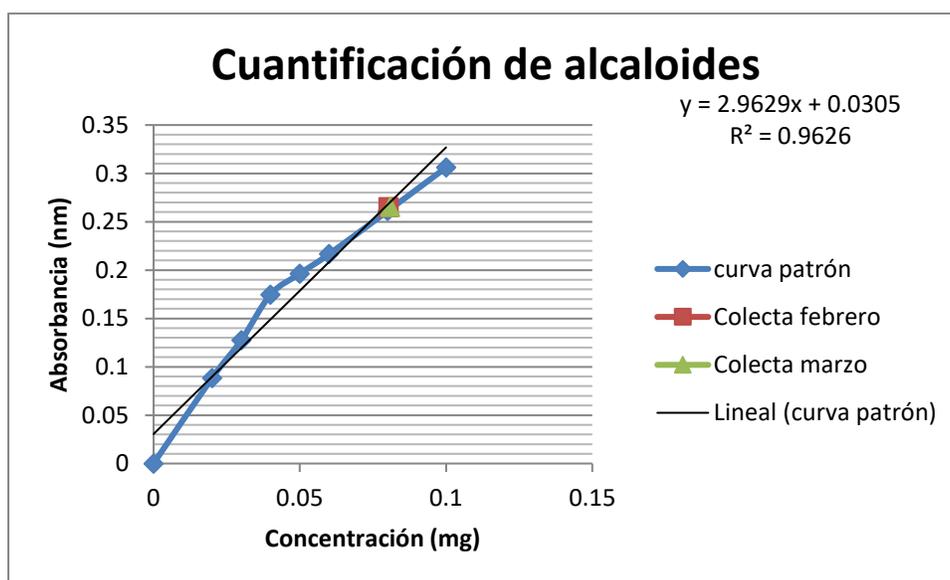
Para obtener los alcaloides a medir, es necesario realizar lavados con cloroformo. Para este efecto, se añaden secuencialmente 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mL. Con ayuda de un agitador automático, se mezcla perfectamente bien en cada lavado; el uso del agitador es necesario para asegurarse de que el cloroformo arrastre la mayor cantidad posible de alcaloides de la muestra. Una vez agitado, en el fondo del tubo se formará un precipitado amarillento, el cual debe recogerse con una pipeta Pasteur y trasladarse a otro tubo.

Nota: De preferencia, comenzar a recoger el precipitado después del segundo lavado.

VI. obtención e interpretación de resultados

Una vez obtenidos los lavados de cloroformo de las concentraciones de la curva patrón y del problema, se leen en un espectrofotómetro a 470 nm.

Para interpolar la muestra problema, se realiza un análisis de regresión lineal y se reporta como miligramos equivalentes de atropina por gramo de extracto.



Apéndice 13

Extracción de alcaloides

Esta técnica se basa en las capacidades de los alcaloides, por un lado, para disolverse en un medio ácido, y por el otro, para ser arrastrados por solventes de baja polaridad, como es el caso del cloroformo.

Procedimiento

- Se disuelven 100 mg del extracto problema en 50 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl) con una normalidad de 0.1.
- Se realizan de uno a tres lavados con cloroformo y se conserva la fase superior (es la fase acidulada).
- Se agrega bicarbonato de sodio (NaHCO_3) suficiente para llevar la solución a una concentración de bicarbonato 0.2 N (verb. Se utilizan 0.84 gramos de carbonato para 50 mL de solución acidulada).
- Se espera a que termine la reacción de neutralización y se realizan otros tres lavados de cloroformo. El cloroformo se recupera y se deja evaporar (En esta extracción van disueltos los alcaloides).

Apéndice 14

Cuantificación de xantofilas por espectrometría

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

Muestra de pigmentos

Se pesan 200 mg del extracto y se colocan en un matraz ámbar aforado de 100 mL.

Disolución extractora HEAT

Se prepara con hexano: etanol absoluto: acetona: tolueno en proporción 10:6:7:7 para preparar 30 mL.

Disolución acuosa de sulfato de sodio al 10%

Se pesan 5 g de Na_2SO_4 y se disuelven en 50 mL de agua destilada.

Disolución de hidróxido de sodio al 40%

Se pesan 2 g de KOH y se disuelven en 5 mL de metanol grado HPLC.

Blanco

Se prepara una disolución HEAT:hexano (1:1)

HEAT (1000 μL :600 μL :700 μL :700 μL); Metanol (3 mL).

Preparación del extracto

1. Se añaden 3 mL de la solución HEAT al matraz ámbar con el extracto y se agita vigorosamente durante 3 minutos.
2. Posteriormente, se añaden 2 mL de la solución de hidróxido de potasio al 40% y se agita suavemente.
3. Se coloca el matraz en baño maría a 56°C durante 20 minutos y se acopla un refrigerante para evitar la evaporación del solvente.

4. Pasados los 20 minutos, se enfría el matraz con un trapo húmedo y se añaden 30 mL de hexano para volver a tapar y agitar.
5. Se lleva al aforo con la disolución de sulfato de sodio al 10%, se tapa y se agita durante 2 minutos.
6. Se deja en reposo hasta la clarificación de la epifase en la oscuridad durante 1 hora.
7. Se determina la absorbancia de la epifase a 474nm (la absorbancia debe ser menor de 1; si es mayor, se debe diluir con hexano). Una vez obtenida la absorbancia, se aplica la siguiente fórmula:

$$(Abs * D) / (g \text{ de } M \times 236)$$

Donde:

Abs: Absorbancia

D: Factor de disolución=50

g de M: gramos de muestra

236: Absortividad de la trans-luteína

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

Apéndice 15

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

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

Muestra de pigmentos

Se pesan 200 mg del extracto y se colocan en un matraz ámbar de 100 mL aforado.

Disolución extractora HEAT

Se prepara con hexano: etanol absoluto: acetona: tolueno en proporción 10:6:7:7 para preparar 30 mL.

Disolución acuosa de sulfato de sodio al 10%

Se pesan 5 gr de Na_2SO_4 y se disuelven en 50 mL de agua destilada.

Disolución de hidróxido de sodio al 40%

Se pesan 2 gr de KOH y se disuelven en 5 mL de metanol grado HPLC.

Blanco

Se prepara una disolución HEAT:hexano (1:1)

HEAT (1000 μL :600 μL :700 μL :700 μL); Metanol (3 mL).

Trizma base

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

Fase móvil

Disolvente A= Acetonitrilo:metanol:Tris HCl 0.1M pH 8 (72:8:3)

Disolvente B= Metanol:hexano (40:10)

*En ambos casos se prepara el doble de los disolventes.

Preparación del extracto

1. Se añaden 3 mL de la solución HEAT al matraz ámbar con el extracto y se agita vigorosamente durante 3 minutos.
2. Posteriormente, se añaden 2 mL de la solución de hidróxido de potasio al 40% y se agita suavemente.
3. Se coloca el matraz en baño maría a 56°C durante 20 minutos y se acopla una solución refrigerante para evitar la evaporación del solvente.
4. Pasados los 20 minutos, se enfría el matraz con un trapo húmedo y se añaden 30 mL de hexano para volver a tapar y agitar.
5. Se lleva al aforo con la disolución de sulfato de sodio al 10%, se tapa y se agita durante 2 minutos.
6. Se deja en reposo hasta la clarificación de la epifase en la oscuridad durante 1 hora.
7. Se inyectan 30 µL de la fase superior en el cromatógrafo de líquidos.

Para las condiciones del HPLC se coloca en la columna ODS-1-5 µ length 2500 mm/400 mm con la fase móvil se mantiene a flujo a 2 mL/min.

Condiciones de polaridad

Se mantiene el disolvente A durante 5 minutos. Posteriormente a 7.5 minutos. Pasar a 100% del disolvente B y mantenerlo 7.5 minutos.

La longitud de onda del detector debe estar fija a 440 nm.

Detector DAD barrido de 200 a 600nm.

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

Apéndice 16

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

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

El equipo utilizado es:

- a) Cromatógrafo de Gases modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C, marca Agilent Technologies.
- b) Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno y 25 micras de película.

Condiciones de corrida para las fracciones (método hexánico)

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

Horno

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 minutos.
- Tiempo de corrida total: 26.67 minutos
- Línea de transferencia: 290°C

Detector del Espectrómetro de Masas:

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

Apéndice 17

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)

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

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

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

EL extracto metanólico que se analizó en el HPLC, presentan las siguientes condiciones:

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

- Extracto metanólico: Se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25.25:50)
- Fracciones activas: se corrió con una mezcla de MeOH-acetonitrilo- H_2PO_4 - H_2O (25:25:0.1:50)
- Flujo: 1 mL/min
- Detector de arreglo de diodos (DAD)
- Longitud de onda de 260nm, realizando un barrido completo de 200-400nm.

Apéndice 18

Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

La cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM) facilita el análisis de muestras que tradicionalmente han sido difíciles de analizar por GC-MS, es decir, analitos poco volátiles. Como resultado, la técnica es ampliamente utilizada en el análisis de fármacos, proteínas, etcétera.

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

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

Aunque la LC-MS utiliza un sistema de HPLC, en el punto en que las fases móviles de líquidos abandonan la columna, la muestra líquida es rociada para producir microgotas, las cuales, al ser evaporadas rápidamente, liberan moléculas de analitos ionizadas que, a continuación, pueden separarse en el espectrómetro de masas.

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

En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presentará pequeñas partículas con ciertas

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

El análisis de las muestras se realizó mediante perfiles cromatográficos en HPLC acoplado a un espectrómetro de masas, empleando un equipo Infinity, y de los cuales, la columna e inyector son modelo 1269 y la columna 1290; el espectrómetro de masas Agilent Technologies 6230 TOF. Para este fin, se utilizó una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150 x 2.1 mm) (Phenomenex) y una fase móvil en gradiente de dos líneas (A y B), donde A= Agua grado HPLC-Acetonitrilo (90:10) y B= Metanol grado HPLC-Atonitrilo (90:10). A ambas se les agregó 0.1% de ácido fórmico. El cromatograma fue comparado con los estándares.

Apéndice 19

Antibiogramas

Los antibiogramas son estructuras que contienen antibióticos de amplio espectro y que sirven como un referente para saber cuál es la sensibilidad de las cepas bacterianas que se tienen en el laboratorio.

En el Laboratorio de Farmacognosia de la UBIPRO (FES Iztacala), se tiene el registro de los siguientes antibiogramas:

a) Antibiogramas para bacterias Gram positivas

Cuadro 23 Antibiogramas para bacterias Gram positivas.

Cepa	Am	E	CF	PE	PEF	CXM	CTX	SXT	CAZ	DC	GE	TE
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 35668	10	19	8	9	19	9	9	29	9	10	15	9
<i>Streptococcus mutans</i> CDBB-B1455	9	20	9	6	12	8	8	9	10	9	12	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	6	20	24	8	30	8	9	39	9	8	28	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	8	22	8	8	14	8	8	16	8	8	13	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	8	22	21	9	29	21	13	30	8	8	28	26
<i>Staphylococcus aureus</i> 85S met. Resistente	8	8	17	9	22	10	9	29	9	9	30	31
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Caso clínico	0	22	0	0	38	0	24	29	0	0	27	23
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	8	8	18	8	27	9	8	30	8	8	30	30
<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	10	11	9	10	19	11	11	32	10	10	9	13
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10	15	10	10	22	10	15	30	9	13	15	12
<i>Actinomyces viscosus</i> WFCC 449	18	23	30	11	23	15	24	26	9	10	25	25

Los resultados están expresados en mm.

b) Antibiogramas para bacterias Gram negativas

Cuadro 24. Antibiogramas para bacterias Gram negativas.

<i>Cepa</i>	LEV	FEP	CF	CTX	SXT	Am	CRO	NF	NET	GE	AK	CL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B 999	30	8	29	8	32	18	12	28	22	22	22	22
<i>Pantoea agglomerans</i> CDBB-B 959	23	13	19	27	8	25	29	12	23	21	24	25
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B 958	28	29	9	21	28	8	28	11	26	21	27	24
<i>Enterobacter cloacae</i> FESC	24	8	9	9	9	8	9	19	21	22	24	25
<i>Enterobacter aerogenes</i> FESC	28	21	9	10	20	9	20	13	22	20	23	20
<i>Escherichia coli</i> FESI, Caso clínico 1	20	9	8	15	28	8	11	23	22	18	25	21
<i>Escherichia coli</i> FESI, Caso clínico 2	33	25	17	28	30	15	34	24	28	26	26	24
<i>Escherichia coli</i> 28-MR	24	21	10	23	27	8	29	19	25	19	25	21
<i>Shigella flexneri</i>	25	20	10	21	28	9	27	18	22	20	25	19
<i>Proteus mirabilis</i> , Caso clínico H.L.A.	32	20	13	27	28	15	33	13	24	17	22	19
<i>Vibrio cholera</i> , Caso clínico	27	8	25	8	19	9	10	31	22	22	22	22
<i>Salmonella typhimurum</i> , FESC	24	19	8	13	19	8	26	9	22	20	25	8
<i>Vibrio cholerae</i> CDBB-1159	25	20	20	26	22	17	28	25	26	15	19	30
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B 968	29	18	9	14	20	9	16	12	23	17	25	19
<i>Salmonella typhi</i> CDBB-B 1111	27	19	9	14	18	9	23	13	22	17	23	22

Los resultados están expresados en mm.

a) Contenido de multidiscos para bacterias Gram positivas

Antibiótico	clave	Contenido µg
Ampicilina	AM	10
Cefalotina	CF	30
Cefotaxima	CTX	30
Cefepime	FEP	30
Cefuroxina	CXM	30
Dicloxacilina	DC	1
Eritromicina	E	15
Gentamicina	GE	10
Levofloxacina	LEV	5
Penicilina	PE	10 U
Tetraciclina	TE	30
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	25

b) Contenido de multidiscos para Gram negativas

Antibiótico	clave	Contenido µg
Amikacina	AK	30
Ampicilina	AM	10
Levofloxacina	LEV	5
Cefalotina	CF	30
Cefotaxima	CTX	30
Ceftriaxona	CRO	30
Cloranfenicol	CL	30
Gentamicina	GE	10
Nietilmicina	NET	20
Nitrofurantoina	NF	300
Cefepime	FEP	30
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	25

c) Sensibilidad

Agente microbiano	Cepa	Contenido del disco	Diámetro del halo		
			R	I	S
Amikacina	Enterobacteriaceae	30 µg	≤14	15-16	≥17
Ampicilina		10 µg			
	Enterobacteriaceae		<13	14-16	>17
	<i>Staphylococcus spp.</i>		<28	-	>29
	<i>Enterococcus spp</i>		<16	-	>17
	<i>Streptococcus spp</i>		-	-	>24
Carbenicilina		100 µg			
	Enterobacteriaceae		<19	20-22	>23
	<i>Pseudomonas aureoginosa</i>		<13	14-16	>17
Cefalotina	Enterobacteriaceae	30 µg	<14	15-17	>18
Cefepime	"	30 µg	<14	15-17	>18
Cefotaxima	"	30 µg	<14	15-22	>23
Ceftazidima	"	30 µg	<14	15-17	>18
Ceftriaxona	"	30 µg	<13	14-20	>21
Cefuroxima	"	30 µg	<14	15-22	>23
Cloranfenicol	"	30 µg	<12	13-17	>18
Dicloxacilina		1 µg			
	<i>Staphylococcus spp</i>		<10	11.0-12.0	>13
Enoxacina	Enterobacteriaceae	10 µg	<14	15-17	>18
Eritromicina		15 µg			
	<i>Enterococcus spp.</i>		<13	14-22	>23
Gentamicina	Enterobacteriaceae	10 µg	<12	13-14	>15
Levofloxacina	"	5 µg	<13	14-16	>17
Netilmicina	"	30 µg	<12	13-14	>15
Nitrofurantoína	"	300 µg	<14	15-16	>17

Pefloxacina		5 µg	<14	15-22	>23
Penicilina		10 U			
	<i>Staphylococcus spp</i>		<28	-	>29
	<i>Enterococcus spp.</i>		<14	-	>15
	<i>N. gonorrhoeae</i>		<26	27-46	>47
	<i>Streptococcus spp</i>		-	-	>24
Tetraciclina	Enterobacteriaceae	30 µg	<14	15-18	>19
Trimetoprim- Sulfametoxazol		25 µg	<10	11.0- 15.00	>16

R= Resistente; I= sensibilidad intermedia; S= Sensible

Literatura citada

- Agüero, M.B., González, M., Lima, B., Svetaz, L., Sánchez, M., Zacchino, S., Feresin, G.E., Schmeda-Hirschmann, G., Palermo, J., Wunderlin, D., Tapia, A. 2010. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(1), 194-201.
- Aguilar, A., Camacho, J., Chino, S., Jáquez, P. y López, E. 1994. Plantas medicinales de herbario del IMSS. Primera Edición. Instituto Mexicano del Seguro Social, México. 253 pp.
- Aguilar, R. A. 2006. Actividad antimicrobiana de *Ceiba parvifolia* Rose (Pochote) de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. México.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. and Lindequist U. 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 657-666.
- Andary, C., Privat, G., Chevallet, P., Orsalesi, H., Serrano, J. J., et Boucard, M. 1980. Etude chimique et pharmacodynamique d'esters hétérosidiques de l'acide caféique, isolés d'Orobanche rapum-genistae. *II Farmaco*, 35(1), 1-30.
- Anónimo. Censo de Población 2001. Secretaría de Salud. Casa de salud de la comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, México. 10 pp.
- Aqeel, A., Khursheed, A., Viqaruddin A. and Sabiha, Q. 1989. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. *Arzneimittelforschung*. 39, 652-655.
- Araújo, J., Lima, E., Ceballos, B., Freire, K., Souza, E. and Filho, L. 2004. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Revista de Patologia Tropical*. 33 (1), 55-64.
- Ardoino, S. 2006. Estudio fitoquímico de extractos con actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* obtenidos a partir de plantas nativas y

- naturalizadas de la Provincia de la Pampa, Argentina. Tesis para doctorado en ciencias veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 91 pp.
- Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* 2(3), 119-145 pp.
 - Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J. and Castaldo, R. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry.* 52, 1479-1482.
 - Bazán, L. 2012. El mezquite previene la diabetes. *Periódico el Decididor.* Tamaulipas, México. 1-4.
 - Beer, E. y Sherwood, M. 1945. The paper-disc agar-plate method for essay of antibiotic substances. *The welcome research laboratories.* 459-467.
 - Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. y Velázquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia.* 30 (8), 453-459.
 - Bezerra, F., 2014. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Myracrodruon urundeuva* e *Prosopis juliflora* frente a *Escherichia coli* produtora de betalactamase de espectro estendido. Tesis de Licenciatura, Universidade Estadual de Paraíba, 31 pp.
 - Brown, S. 1985. En: *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe.* Vol 25. Van Sumere C. y Lea P. (Eds) Clarendon Press, Oxford.
 - Bussmann, R., Glenn, A., Meyer, K., Rothrock, A., Townesmith, A., and Sharon, D.. 2009. Antibacterial activity of medicinal plants of northern Peru- Part II. *Arnaldoa.* 16(1): 93-103.
 - Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínicas.* 27(1), 44-52.
 - Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A. and Lira, R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology.* 97: 429-439.

- Carballo-Villalobos, A., Gonzalez-Trujano, M., and Lopez-Munoz, F. 2014. Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acetaminophen. *European Journal of Pain*. 18(3), 396- 405.
- Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J., Dávila, P., Lira R., Cortés L., Medina, R. y Rodríguez-Arévalo, I. 2001. Plant Resources of the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. *Economic Botany*. 55 129-166.
- Castro, A. 2016. Estudio preliminar de la actividad antibacteriana de la flor de *Prosopis laevigata* (Humb.et Bonpl. Ex Wild) M.C. Johnst. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, México. 101.
- Castro, G., 2002. Ácidos grasos omega-3: beneficios y fuentes. *Interciencia*. 27(3), 128-136.
- Cervantes, R. y Concepción, M. 2002. Plantas de importancia económica en las Zonas Áridas y Semiáridas de México. Primera Edición. México, D.F. 53-62.
- CLSI., 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for microbial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep. M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA, 184 p.
- Cole, M. 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. *Biochemical Systematic and Ecology*. 22(8), 837-856.
- CONAZA e INE. 2000. El mezquite *Prosopis* spp. Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Todos Santos. 52 pp.
- Cooper, R., Solomon, P., Kubo, I., Nakanishi, K., Shoolery J. N., and Occolowitz, J. 1980. Myricoside, an african armyworm antifeedant: separation by droplet countercurrent chromatography. *Journal of the American Chemical Society*, 102, 7953-7955.
- Cortés, J. 2005. Actividad de extractos de plantas usadas en el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepantepec, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 139 p.

- Corzo, A., Bravo, E., Serrano, F. y Vattuone, M. 2009. Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a cepas patógenas humanas y fitopatógenas. Quebracho, 17, 106-114 pp.
- Cronquist, A. 1969. Introducción a la Botánica. CECOSA, México D.F.
- Cruz, R. y Rosas, O. 2013. La Flor. En: Biología de las Angiospermas. Márquez, J., Collazo, M., Martínez, M., Orozco, A. y Vázquez, S. (Eds.). UNAM, Facultad de Ciencias: Coordinación de Investigación Científica. 632p.
- Cruz, S.J.S., 2007. Más de 100 plantas medicinales. Medicina Popular Canaria. Primera Edición. Las Palmas, Gran Canaria, España. 17-38.
- Cunha, R., 2012. Avaliação da actividade antifúngica dos extractos hidroalcoólicos da folha e casca de *Prosopis juliflora* (sw.), D.C. sobre espécies de *Cândida* de interesse médico. Universidade Estadual de Paraíba, 27 pp.
- Dávila, P., Arizmendi, M., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J., Casas, A. and Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. Biodiversity and Conservation. 11: 421-442.
- Delatorre, J., Pinto, M., Cardemil, L. 2008. Effects of water stress and high temperature on photo-synthetic rates of two species of *Prosopis*. Journal of Photochemistry and Photobiology. 92, 67-76.
- Domínguez, X.A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, México. 281 pp.
- Dos Anjos, R., 2012. Avaliação da actividade antifúngica dos extractos hidroalcoólicos da folha e casca de *Prosopis juliflora* (sw.), D.C. sobre espécies de *Cândida* de interesse médico. Universidade estadual de Paraíba, 27 pp.
- Elliot, T. 1999. Antibacterial resistance in the intensive care unit. Mechanisms and management. Br Med Bull. 55(1), 259-276.
- Fernández, B. Ma. N., 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de

Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 98 pp.

- Fernández, F., López J., Ponce L. y Machado C. 2003. Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 32 (1): 44-48.
- Ffolliot, P. y Thames, J. 1983. Manual sobre taxonomía de México, Chile y Perú. Depósito de documentos de la FAO. En <http://www.fao.org/docrep/006/Q2580S/Q2580S00.HTM>, revisada el 9 de septiembre de 2016.
- Flores, N. 2011. Malinalli-Herbolaria Médica (15_04_11) Nutrición y medicamentos herbarios. Guatemala. Disponible en: <http://malinalli-herbolariamedica.blogspot.mx>
- Flores, T. F. J., 1993. Atributos ecológicos y aprovechamiento del mezquite. *Revista Investigación y Ciencia* No. 9, edición cuatrimestral, año 3. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 24 – 30 p.
- Frías-Hernández, J., Olalde-Portugal, V. y Vernon-Carte, E. 2000. El mezquite. *Árbol de usos múltiples: estado actual del conocimiento en México*. Universidad de Guanajuato, México. 247p.
- García, E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen adaptado para las Condiciones de la República Mexicana. 3° Ed. Offset., Lario Ed. S.A. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 3:252.
- Gamboa-de Buen, A., Burgeff d'hont, C. y Zúñiga E.¹ 2013. Cambio de la Fase vegetativa a la reproductora. En: *Biología de las Angiospermas*. Márquez, J., Collazo, M., Martínez, M., Orozco, A. y Vázquez, S. (Eds.). UNAM, Facultad de Ciencias: Coordinación de Investigación Científica. 632p.
- Gamboa-de Buen, A., Burgeff d'hont, C. y Zúñiga E.² 2013. Inducción floral por fotoperiodo y vernalización. En: *Biología de las Angiospermas*. Márquez, J., Collazo, M., Martínez, M., Orozco, A. y Vázquez, S. (Eds.). UNAM, Facultad de Ciencias: Coordinación de Investigación Científica. 632p.

- García, M. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos naturales. En http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf. Consultada el 13 de agosto de 2016.
- Ghannoum, M. A., Long, M., 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.
- Goodman, R., Kiraly, Z., and Wood, K. 1986. En: *Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press, Columbia.
- Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes, A. M., Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 25-31 pp.
- Gutiérrez, A., Ortiz, G., y Mendoza, C. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. 1-5.
- Gutiérrez, M.A., 2002. Café, Antioxidantes y protección a la Salud. *MEDISAN*. 6(4), 72-81.
- Harbone, J. 1994. *The flavonoids: Advances in Research since 1986*. 1° Ed, Ed Chapman and Hall. Inglaterra.
- Haro, A., Artavho, R. y Cabrera-Vique, C. 2006. Ácido linoleico conjugado: interés actual en nutrición humana. *Medicina Clínica*. 127(13), 508-515.
- Hart, C. 1998. La resistencia los antibióticos, ¿Un problema creciente? *Br. Med J. (Ed. Latinoam)*. 6, 147-148.
- Havlickova, B., Czaika, V. A. and Friedrich, M. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 51, 2-15.
- Hernández, T., Canales, M., Caballero, J., Durán, A. y Lira, R. 2005. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, México. *Interciencia*. 30, 529-535.

- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*. 342, 1007–1011.
- Ho, S. Kumar, A., Sung, D., Mi, S., Sang, S., Ha, K., Ha, D., and Youl, J. 2011. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*. 16, 3338-3344.
- <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/72/usos.html>, consultada el 7 de agosto de 2016.
- Iyobe, S. 1997. Appearance of extended spectrum beta Lactamases. *Nihon Rinsho*. 55(5),1219-24.
- Jeong, H., Shin, Y., Kim, I., and Pezzuto, J. 1999. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. *Archives of Pharmacol Research*. 22, 309-312.
- Jiang, H., Liang, C., Liu, X., Jiang, Q., He, Z., Wu, J., Pan, X., Ren, Y., Fan, M., Li, M. y Wu, Z. 2010. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis*. 210 (1), 33-37.
- Jung, J., Pummangura, S., Chaichantipyuth, C., Patarapanich, and C., McLaughlin, J. 1990. Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry*. 29(5), 1667-1670.
- Jung, S., Kim, J., Lee, S., Lee, M., Byun, S, Kim, Y., Lim, T., Reddy, K., Huang, Z., Bode, A., Lee, H., Lee, K., and Dong, Z. 2014. The P110 subunit of PI3-K is a therapeutic target of acacetin in skin cancer. *Carcinogenesis*. 35(1), 123-130
- Kalita, P., Barman, T., Pal, T. and Kalita, R. 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 3(4): 33-37.
- Kimura, Y., Okuda, H., Nishibe, S. and Arichi, S. 1987. Effects of caffeoylglycosides on arachidonate metabolism in leukocytes. *Planta Medica*, 53: 148-153.

- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R. y Sommers, H. M. 1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 909 pp.
- Kumar, P., Kumaravel, S. y Lalitha C. 2010. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. African Journal Biochemistry Research. 4(7): 191-195.
- Lee, K. 2004. Current developments in the discovery and design of new drugs candidates from plant natural products leads. Journal of Natural Products. 67: 273-283.
- Lien, E., Ren, S., Bui, H., and Wang, R. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. Free Radical Biology and Medicine, 26: 285-294.
- Lira, R., Caballero, J. y Casas, A. 2001. Los recursos vegetales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde una perspectiva etnobotánica. Informe Técnico. Proyecto CONACYT 400389G35-450. México. 60 pp.
- López, C. 1984. Efecto del termoperíodo en el crecimiento del tamarugo (*P. tamarugo*). En: Habit, (ed.) Estado actual del conocimiento sobre *Prosopis tamarugo*. FAO. Santiago. pp. 299-309.
- Maidana, J., 2008. Actividad antibacteriana de mieles monoespecíficas de algarrobo, eucalipto y chilca frente a cepas meticilina resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureoginosa* y *Escherichia coli*. Revista Espacio Apícola. 81.
- Mata, S., Zolla, C. y Arguete, A. 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM. Tomado el 10 de enero de 2016. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G. 2002. Bioquímica. 3a ed. Addison Wesley. España. 166-170 pp.
- McClure, J. 1975 En: The Flavonoids. Harbone J., Malory T. and Malory H. (Eds). 1° Ed. Editorial Chapman and Hall, Inglaterra.
- Medina, S.J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis de Licenciatura Biología. UNAM, Facultad de Ciencias, México. 35.

- Montes-De-Oca-Márquez, C., Hernández-Delgado, C., Orozco-Martínez, J., García-Bores, A., Ávila-Acevedo, J., Ortiz-Melo, M., Peñalosa-Castro, I., López-Moreno, G. y Serrano-Parrales, R. 2017. Actividad antibacteriana y antifúngica de *Dalea carthagenensis* (JACQ.) J. F. MACBR. Revista Fitotecnis Mexicana. 40, 161-168.
- Muñoz, K., Arango, G., y Jaramillo, M. 2004. Los antibióticos y su situación actual. Vitae, revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 11: 21-33.
- Molyneaux, P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakar Journal of Science and Technology. 26(2): 211-219.
- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. y Takatsuki A. 1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of VATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. Cell Structure and Function. 18, 139–149.
- Murray, R., Mendez, J. and Brown, S. 1982. The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry. 1° Ed. Editorial John Wiley, Chinchester
- Niño, J., Correa, Y., and Mosquera, O. 2006. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombia Biodiversity. Pharmaceutical Biology. 44(1), 14-18.
- Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer, and M., Duez, P. 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (*Boraginaceae*). Journal of Ethnopharmacology. 112, 476-481.
- Paladini, A., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C., and Medina, J. 1999. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 51:519-526.
- Paredes, F. 2001. Contribución al estudio etnobotánico de la flora útil de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. Tesis. UNAM. México. 109 pp.

- Pérez, C., Tiraboschi, I., Ortega, M., Agnese, A. and Cabrera, J. 2003. Further antimicrobial studies of 2'4'-dihidroxy-5'-(1''dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin from *Dalea elegans*. *Pharmaceutical Biology*. 41: 171-174.
- Pérez, R. 2000. *Microbios y enfermedades*. Primera edición. Fondo de Cultura Económica, México.
- Pinzón, R., y Sánchez C. 1995. *Manual de técnicas de investigación: CYTED*. 63-70.
- Rahua, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. and Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56, 3–12
- Ramamoorthy, P. and Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2(1), 70-80.
- Reynaldo, I. and Cartaya, O., 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones cultivos tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba. 22(2), 5-14.
- Rhagavendra, M., Satish, S. and Raveesha, K. 2009. Alkaloid extracts of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (Mimosaceae) against *Alternaria alternata*. *Journal of Biopesticides*. 2(1): 56-59.
- Rhodes, M.J.C.1985. *In* "Biochemistry of Plant Phenolics, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe". Vol. 25 (Van Sumere C.F. and Lea P.J. Eds). Clarendon Press Oxford. 99-117.
- Rodríguez, S., Rojo, M., Ramírez, V., Martínez, R., Cong, H., Medina, T. y Piña, R. 2014. Análisis técnico del árbol mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Wild.) en México. Ra Ximhai. Edición Especial Universidad Autónoma Indígena de México Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. 10 (3), 173-193.
- Roldán, M. 2004. Patrones demográficos de *Prosopis laevigata* en un ambiente fragmentado del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, México. 46 p.

- Rosas, L. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalneplantla, México. 94.
- Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosidae) en Norteamérica. Acta Botánica Mexicana. 3, 7-19.
- Saeed, N., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H., Algandarby, M., Al-Abbasi, F. and Abde-Nim, A. 2012. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. Toxicology and Applied Pharmacology. 264(1), 84-93.
- Salcedo-Sánchez, B. 1996. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura, Biología, UNAM. Facultad de Ciencias, 6-10.
- Salinas D., Arteaga G., León I., Dorado O., Vallarades M., Navarro V. 2009. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Hautla Sierra Biosphere in Morelos (México). Polibotánica. 28, 213-225.
- Sánchez, E. 2012. Efecto de compuestos fitoquímicos sobre microorganismos de importancia en alimentos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, México. 50 p.
- Sarukhán, J. 1995. Diversidad biológica. Revista de la Universidad de México. 536-537, 3-10.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. and Verdian-rizi, M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thai Journal Pharmacology Science. 32, 17-20.
- Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela-Reventós, R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology. 299, 152-178.
- Soares da Silva, R., Santos da Oliveira, K. y Cavalcante, G. 2015. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias ocorrentes em úlceras crônicas

aos extractos brutos de *Prosopis juliflora*. Revista Saúde e Pesquisa 3, pp 493-499.

- Surico, G., Varvaro, L., and Solfrizzo, M. 1987. Analysis of the herbicide diuron in chips. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 35: 406-409.
- Tabosa, I., Quintans-Júnior, L., Pamplona, F., Almeida, R., Cunha, E., Silva, M. y Souza J. 2000. Isolamento biomonitorado de alcalóides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algarroba). Revista Brasileira de Farmacognosia. 9/10, 11-22.
- Tatsimo, J., Tamokou, J., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J. and Tane P. 2012. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. BMC Research Notes. 5, 158.
- Toursarkissian, M. 1980. Plantas Medicinales de la Argentina: sus nombres Botánicos, Vulgares, Usos y distribución Geográfica. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Trapero, Q.Y.M., 2013. Farmacocinética y Toxicología del 4-Hidroxi-3-Metoxibenzaldeído (Vainillina) en modelos *In vivo*. Universidad de Oriente. Centro de Biofísica Médica. La Habana. 1-158.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Inuma, M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology. 50, 27–34.
- Valiente, B.L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Autónoma de México, México. 65.
- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara A., Dávila P., Flores-Hernández, M., Arizmendi, M.C., Villaseñor, J.L. y Ortega R., 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 67, 24-75.

- Van Sumere, C., Abrecht, J., Dedonder, A., De Pooter, H. and Pé, I. 1975. En: Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins. Harbone J. and Van Sumere C. (Eds). Academic Press, London.
- Vanaclocha, B., y Cañigüeral, S. 2003, Fitoterapia. Vademécum de prescripción. 4a edición. Editorial Masson Doyman. España. 15 pp.
- Vanden Berghe, D. A. and Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Hostettmann, K. Series editor Dey, P. M. Academic Press. New York, USA. p 47-71.
- Wang, H. and Bun, T., 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry. 61, 1-6 pp.
- Wang, X. and Ng, T. 2002. Isolation of cicadin, a novel and potent antifungal peptide from juvenile cicadas. Peptides. 23, 7-11.
- Wang, X. and Ng, T. 2007. Isolation and characterization of an antifungal with peptide with antiproliferative activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. "Spotted bean". Applied Microbiology and Biotechnology. 74, 125-130.
- Zhao, N, Dong, Q, Fu, X., Du L., Cheng, X, Du, Y. and Liao, Y. 2014. Acacetin blocks Kv1.3 channels and inhibits human T cell activation. Cellular Physiology and Biochemistry. 34(4), 1359-1372.
- Zheng, C., Yoo, J., Lee, T., Cho, H., Kim, Y. and Kim, W. 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. Federation of European Biochemical Societies. 579, 5157-5162.