



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**VARIACIÓN TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE *BEISELIA MEXICANA*
(FORMAN) (BURSERACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO

DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

Gabriela Rivera Ojeda



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Rocío Serrano Parrales**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de
México 2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en la
Unidad de Biotecnología y Prototipos en
el Laboratorio de Farmacognosia de la
Facultad de Estudios Superiores
Iztacala.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

A la Facultad de Estudios Superiores por ser un hogar más y vivir experiencias inolvidables.

A mi tutora, Dra. Rocío Serrano Parrales, por ser una guía desde el comienzo de la carrera, por la gran ayuda que me brindo, por su paciencia, su enseñanza, su tiempo y consejos.

A la Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado, por contribuir con sus conocimientos para la realización de este proyecto. Y de igual manera, por ser parte importante de mi formación académica.

A la M. en C. Julieta Orozco por el apoyo brindado y la revisión de este trabajo.

A la Dra. María Félix Ordoñez por su paciencia para explicarme cualquier duda y por las revisiones para mejorar el proyecto.

Al Dr. Guillermo Ávila Acevedo, por la revisión de la tesis.

Al M. en C. Erik Nolasco Ontiveros, por su ayuda y consejos durante la realización del trabajo.

Al Biol. Carlos Verdía Guzmán por la colecta de la corteza de *B. mexicana* para poder realizar el presente trabajo.

A la Comunidad Santa María de Ostula, por permitir la colecta de *B. mexicana*.

A Xime, Ale y Gelos por su ayuda durante la experimentación, las risas, los buenos momentos que pasamos en el laboratorio y por su amistad. Los quiero.

DEDICATORIA

A Dios por la oportunidad de estar.

A mis padres, Catalina y José por su amor incondicional, por nunca dejarme sola y apoyarme en todo momento. Por su esfuerzo para que pudiera llegar a cumplir este logro y confiar una vez más en mí. A ti, mamá por las noches de compañía, por tus consejos y motivaciones; gracias papá por querer lo mejor para mí y por tu compañía cada mañana.

A mis hermanos, Ely y Luisito por su entusiasmo, alegría y ayuda; por cada recibimiento a casa después de una práctica. Este logro también es suyo. Los quiero.

A mis tías, Juana, Nieves, Naty, Cristina y Petra por estar siempre al pendiente de mí por llenar mi vida de alegría. Les agradezco mucho poder contar con ustedes.

A Erik por darme su apoyo siempre y estar conmigo en los momentos más difíciles y no permitirme caer. Gracias por todo.

A la Dra. Rocío Serrano Parrales porque fue una gran maestra, por toda su ayuda y comprensión. ¡Es la mejor!

A la Dra. Tzasná por su entusiasmo para alentarnos a seguir adelante, por permitirme ser parte del Laboratorio y siempre estar dispuesta a ayudarnos ¡También es la mejor!

A mis amigas:

Dana, por ser una de las primeras personas que conocí y que hasta la fecha ha perdurado nuestra amistad.

Etna y Marina por toda tu ayuda durante la carrera, por cada momento que pasamos juntas, sus consejos y locuras, por los ratos llenos de risas,

Almita, por tu bonita amistad y por tener siempre una palabra de aliento. Gracias por todo tu apoyo.

*“El propósito general de la educación es convertir espejos en
ventanas”*

Sydney J. Harris

Índice general

Índice general.....	I
índice de cuadros.....	II
Índice de figuras.....	III
Resumen.....	IV
1. Introducción.....	1
1.1 Medicina Tradicional.....	1
1.2 Metabolismo secundario.....	2
1.3 Funciones ecológicas de los Metabolitos Secundarios.....	4
1.4 Enfermedades infecciosas.....	7
1.4.1 Resistencia bacteriana.....	8
1.5 Familia Burseraceae.....	10
1.6 Antecedentes de estudios sobre la tribu Bursereae.....	11
1.7 <i>Beiselia mexicana</i> (Forman).....	13
2. Pregunta científica.....	16
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	16
4.1 Objetivo General.....	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
5. Materiales y métodos.....	17
5.1 Obtención y caracterización de los extractos.....	17
5.1.1 Colecta del material vegetal.....	17
5.1.2 Preparación de los extractos.....	18
5.1.3 Pruebas fitoquímicas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos.....	18
5.2 Actividad antimicrobiana.....	18
5.2.1 Actividad antibacteriana.....	18
• Evaluación cualitativa.....	19
• Evaluación cuantitativa.....	19
• Cinética de crecimiento en la población bacteriana.....	20
5.2.2 Actividad antifúngica.....	20
• Evaluación cualitativa.....	20
• Evaluación Cuantitativa.....	21
5.3 Análisis estadísticos.....	22
6. Resultados.....	23

6.1 Obtención y caracterización de los extractos.....	23
6.1.1 Datos etnobotánicos de <i>B. mexicana</i>	23
6.1.2 Extracción	23
6.1.3 Pruebas fitoquímicas de los extractos.....	24
6.2 Actividad antimicrobiana.....	25
6.2.1 Actividad antibacteriana	25
• Evaluación cualitativa	25
• Evaluación cuantitativa	27
• Cinética de crecimiento en la población bacteriana.....	28
6.2.2 Actividad antifúngica.....	32
• Evaluación cualitativa	32
• Evaluación cuantitativa	32
7. Discusión	36
8. Conclusión	42
9. Apéndices.....	43
9.1 Apéndice I	43
a) Descripción botánica de <i>B. mexicana</i>	43
b) Información taxonómica.....	44
9.2 Apéndice II	45
Método de maceración.....	45
9.3 Apéndice III	46
Pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios.....	46
9.4 Apéndice IV.....	47
Método de difusión en agar Kirby-Baüer	47
9.5 Apéndice V.....	49
Método modificado de dilución en agar	49
9.6 Apéndice VI.....	50
Cinética de crecimiento en la población bacteriana.....	50
9.7 Apéndice VII.....	51
Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial	51
9.8 Apéndice VIII.....	52
Método de dilución en agar en hongos miceliados.....	52
10. Referencias.....	53

Índice de cuadros

Cuadro 1. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.....	10
Cuadro 2. Actividad biológica de algunas especies de la tribu Bursereae.....	12
Cuadro 3. Cepas bacterianas utilizadas para los bioensayos.....	18
Cuadro 4. Cepas fúngicas utilizadas para los bioensayos.....	20
Cuadro 5. Datos generales de <i>B. mexicana</i>	23
Cuadro 6. Rendimiento de los extractos de la corteza de <i>B. mexicana</i> colectada en la temporada de lluvias y seca.....	23
Cuadro 7. Principales grupos de metabolitos secundarios (MS) en los extractos de <i>B. mexicana</i>	24
Cuadro 8. Actividad antibacteriana de los extractos de <i>B. mexicana</i> : comparación por temporada de colecta.....	26
Cuadro 9. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos de <i>B. mexicana</i> colectada en la temporada seca.....	27
Cuadro 10. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extracto de <i>B. mexicana</i> colectada en la temporada de lluvias.....	28
Cuadro 11. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>B. mexicana</i> sobre hongos miceliados.....	32
Cuadro 12. Concentración fungicida media (CF ₅₀) de los extractos de <i>B. mexicana</i> sobre hongos filamentosos.....	33

Índice de figuras

Figura 1. Árbol y corteza de <i>Beiselia mexicana</i>	14
Figura 2. Ubicación geográfica de Aquila, Michoacán.....	17
Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones del extracto metanólico sobre el crecimiento en la población bacteriana sobre <i>S. aureus</i> 23 MR.....	30
Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones del extracto metanólico sobre el crecimiento en la población bacteriana sobre <i>K. pneumoniae</i>	31
Figura 5. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>B. mexicana</i> colectada en la temporada de lluvias.....	34
Figura 6. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>B. mexicana</i> colectada en la temporada seca.....	35
Figura 7. <i>Beiselia mexicana</i>	43
Figura 8. Ejemplar de herbario de <i>B. mexicana</i>	44

Resumen

Introducción: Los efectos biológicos de las plantas se deben a los productos del metabolismo secundario, los cuales se producen en respuesta a factores de estrés biótico y abiótico. *Beiselia mexicana* ha sido descrita en la localidad de Aquila, Michoacán donde es usada para tratar padecimientos infecciosos.

Objetivo: Determinar y comparar el efecto antimicrobiano de *B. mexicana* colectada en temporada seca y de lluvias.

Método: La especie fue colectada en la temporada seca y de lluvias en Aquila, Michoacán. Los extractos hexánico, acetónico y metanólico se obtuvieron mediante la técnica de maceración. La actividad antibacteriana se evaluó mediante los métodos de difusión y dilución en agar sobre nueve cepas de bacterias Gram positivas y 10 Gram negativas. Las curvas de crecimiento microbiano se realizaron en las cepas bacterianas más susceptibles a los extractos. La actividad antifúngica se evaluó mediante los métodos de inhibición del crecimiento radial y dilución en agar en tres cepas de hongos levaduriformes y cuatro miceliados. La composición química de los extractos se determinó mediante pruebas cualitativas.

Resultados: El extracto metanólico de la temporada de seca fue el más activo, al inhibir un mayor número de cepas bacterianas (cinco Gram positivas y cuatro Gram negativas) y tres hongos miceliados. Las cepas más sensibles al extracto fueron *M. luteus*, *P. aeruginosa* (CIM= 0.25 mg/mL) y *A. niger* (CF₅₀ = 1.10 mg/ mL). El extracto mencionado mostró un efecto bactericida sobre *K. pneumoniae* a las 12 horas después de su aplicación en la concentración de 9.0 mg/mL. Por otro lado, el extracto acetónico de la temporada de lluvias inhibió el crecimiento bacteriano de seis cepas (cuatro Gram positivas y dos Gram negativas). El extracto metanólico mostró un efecto bactericida sobre *S. aureus* después de las 24 horas de haber aplicado el extracto en las concentraciones de 6.0 y 9.0 mg/mL. De igual modo, el mismo extracto mostró actividad antifúngica sobre *A. niger* (CF₅₀ = 0.65 mg/mL). Respecto a la composición química, el extracto metanólico de la colecta de la temporada seca mostró mayor diversidad en el contenido de grupos de metabolitos secundarios, en comparación con los tres extractos colectados en la temporada de lluvias.

Conclusión: Los resultados permiten avalar el uso de *B. mexicana* en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso y permiten determinar que la actividad antibacteriana ocurre de manera diferencial entre la temporada de lluvias y seca.

1. Introducción

1.1 Medicina Tradicional

La medicina tradicional ha trascendido gracias a la comunicación oral y escrita desde tiempos inmemoriales (Hoggesteger, 1994). Antes de la llegada de los conquistadores los antiguos pobladores desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo debido al conocimiento que poseían acerca del uso, las propiedades y las cualidades de una gran cantidad de plantas (Cosme, 2008); este conocimiento fue el resultado de incontables observaciones y experimentos empíricos de generaciones. Posterior a la llegada de los españoles a México, se introdujo otra forma de curación e incorporación de diferentes plantas medicinales que se preservaron en las fuentes más antiguas, tales como estelas, códices precolombinos, pinturas, cánticos, poemas, etcétera (Argueta, 1987; Gómez-Pampa, 2015)

Las culturas tradicionales han conservado esos conocimientos debido a las necesidades de la mayoría de la población en países en desarrollo como México, ya que la atención médica está limitada por factores económicos, culturales y, en especial, por los altos costos de los medicamentos patentados (OMS, 2013). Por ende, las plantas medicinales, con frecuencia, son el único tratamiento al que puede acceder la población con bajos recursos. Son accesibles y asequibles y contribuyen a disminuir la importación de medicamentos, además de promover la autosuficiencia (Akerlele, 1993; Correa, 2002;).

La medicina tradicional también desempeña un papel importante en la ciencia, a partir del siglo XX en México surgieron grupos de investigación científica para el estudio de las plantas medicinales (Osuna *et al.*, 2005). Muchos productos se basan en el material biológico obtenido a partir de ellas, ya que poseen una amplia gama de principios activos (Correa, 2002), los cuales producen efectos curativos en las enfermedades del ser humano y de los animales en general (Cosme, 2008).

Por tanto, la noción y uso de las plantas por diferentes grupos humanos ha sido tan diverso como las comunidades vegetales existentes, pues México es uno de los países de América con mayor riqueza ancestral y ocupa el primer lugar en número de grupos indígenas. La mayoría de los recursos vegetales en México se encuentran en zonas rurales ubicadas por debajo del paralelo 27°, área del país que concentra una gran diversidad vegetal terrestre (Rendón *et al.*, 2001).

Además, el territorio mexicano alberga entre el 60 y 70% de la diversidad biológica distribuida en un múltiple mosaico ambiental (CONABIO, 2009) dentro de este ambiente de mega diversidad existen 4000 especies de plantas con flores, aproximadamente el 15% de la flora total tiene propiedades medicinales, no obstante, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica se ha llevado a cabo solo en el 5% de las especies con potencial medicinal (Ocegueda *et al.*, 2005). Por ello se ha reconocido paulatinamente la aportación de la medicina tradicional a la salud, además de desempeñar un papel importante en el desarrollo económico y al mismo tiempo la autoatención y la prevención de enfermedades para reducir los gastos sanitarios (OMS, 2013).

Los efectos biológicos de las plantas se deben a los productos del metabolismo secundario (Almaraz *et al.*, 2006), entre los que se encuentran los terpenoides, alcaloides y fenilpropanoides (Valle, 2012). La distribución y acumulación de los metabolitos secundarios en las estructuras o tejidos de las plantas es influenciada por los factores bióticos (herbívoros y microorganismos) y abióticos (luz, humedad, altitud, latitud y temporada del año) con los que interactúan (Ganjewala *et al.*, 2009; García-Rodríguez *et al.*, 2012).

1.2 Metabolismo secundario

Los medicamentos que se han producido a base de plantas, se debe a que ellas producen diversos compuestos químicos y moléculas bioactivas a través del conjunto de reacciones químicas llamado metabolismo (Shilpa *et al.*, 2010). Los metabolitos primarios son todos aquellos que son responsables de la estructura y

las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento y reproducción del organismo, así la mayor parte del carbono, nitrógeno y energía son destinadas a todas las células para el funcionamiento primordial de la respiración, proceso fotosintético, asimilación de nutrimentos, síntesis de carbohidratos, proteínas y lípidos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Algunas moléculas, productos del metabolismo primario (acetato, mevalonato, shikimato y aminoácidos) son precursores de los metabolitos secundarios (MS) (González y Castro, 2017). Una síntesis de MS puede variar para cada tipo de tejido y órgano (García-Rodríguez *et al.*, 2012;).

Las plantas son la principal fuente de obtención de MS, compuestos de bajo peso molecular, que por sus propiedades se aplican en fármacos, protección de cultivos, tintes, fragancias, etcétera (Trethewey *et al.*, 2007; González y Castro, 2017), estos son llamados usualmente productos naturales vegetales y son diferentes en cuanto estructuras, propiedades y orígenes biosintéticos (Ringuelet y Viña, 2013).

Se estima que existen más de 100,000 MS que son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005), de los cuales se conocen aproximadamente 20,000 que han sido clasificados en familias por sus características estructurales, las principales son las siguientes:

- **Fenilpropanoides:** estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Son un grupo diverso, desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. También se encuentran los pigmentos flavonoides. Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).
- **Terpenos:** los terpenoides derivan de cinco unidades de carbonos, llamado isopreno (C5), y se clasifican de acuerdo con el número de unidades de isopreno. En las plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil

pirofosfato (DMAPP). Se sintetizan mediante dos vías, la ruta del mevalonato que se lleva al cabo en el citoplasma y la vía del metileritritol fosfato (MEP) la cual que se realiza en los plástidos (Eisenreich *et al.*, 2001; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

- **Glucósidos:** existen tres grupos de glicósidos; saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).
- **Alcaloides:** los alcaloides son compuestos heterocíclicos que se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides (Facchini, 2001).

Los MS cumplen funciones diversas en los organismos, son aprovechados por las plantas que los sintetizan para interactuar con el ambiente, ya sea para atraer insectos (polinizadores) o repeler herbívoros, impedir la competencia con otra planta, adaptarse a las condiciones de estrés ambiental (Akula y Ravishankar, 2011; Ringuélet y Viña, 2013).

1.3 Funciones ecológicas de los Metabolitos Secundarios

A través de la evolución las plantas han desarrollado diferentes formas de vida y estrategias que están especializadas a las limitaciones de los recursos impuestas por la variación espacial y temporal, así como por la selección ejercida por la herbívora, esto les permite la mejor distribución de los nutrientes para crecer, reproducirse y defenderse del daño ocasionado por el ataque de insectos o microorganismos patógenos (Bryant *et al.*, 1983; Vivanco *et al.*, 2005). Las plantas tienen mecanismos de defensa constitutiva e inducida, la primera corresponde a una protección permanente de la planta como defensas estructurales (presencia de capas gruesas de cutícula, tricomas, ceras, corteza gruesa, espinas) y defensas químicas (fenoles, alcaloides, terpenos, entre otros); las segunda es una respuesta

activa después de un ataque por herbívora o patógenos (Madriz, 2002; Anaya y Espinosa-García, 2006).

Así mismo, y como parte de la protección química, las plantas sintetizan MS y estos varían de acuerdo con la familia, género, especie y entre los diferentes órganos de la planta (Shilpa *et al.*, 2010), esta variabilidad de perfiles de las diferentes especies es parte de la estrategia de adaptación de las plantas a su ambiente (Espinosa-García, 2001).

Un número considerable de MS sintetizados por las plantas están involucrados en la interacción con otros organismos, como el establecimiento de la simbiosis y la atracción de ciertos insectos polinizadores por compuestos volátiles liberados en frutos y flores (García-Rodríguez *et al.*, 2012). Sin embargo, una síntesis activa de MS tiene una función protectora frente a herbívoros y parásitos ya que proporcionan al vegetal sabores amargos, o sustancias tóxicas para alejar a sus depredadores (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Granados-Sánchez *et al.*, 2008;). También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos (Akula y Ravishankar, 2011), e inciden sobre el ciclo vital de plantas, algas, bacterias y hongos por competencia de recursos (Reigosa *et al.*, 1999; González y Castro, 2017).

Todas las plantas se adaptan fisiológicamente a un bajo suministro de recursos en la misma manera a través de una tasa de crecimiento decreciente (Chapin, 1991). En hábitats con recursos óptimos las plantas tienen un crecimiento rápido con el fin de superar la competencia y captar los recursos disponibles, en este ambiente hay una fuerte selección para invertir carbono directamente en el crecimiento, en lugar de defensas químicas en condiciones severas, como las que se dan en climas áridos, en donde las plantas leñosas tienden a aumentar sus defensas para protegerse contra la herbívora y patógenos, en vez de adquirir recursos necesarios para un rebrote (Bryant *et al.*, 1992), ya que las plantas son menos capaces de adquirir los recursos necesarios para reemplazar los tejidos perdidos, es decir, este equilibrio afecta en la asignación de recursos al metabolismo secundario (Bryant *et al.*, 1983).

Existen factores ambientales (bióticos y abióticos) que pueden restringir el crecimiento y desarrollo y, por tanto, producen estrés en la planta (Levitt, 1980), en la limitación nutricional tiene un efecto más relevante en el crecimiento de la planta entera que en la actividad fotosintética, por lo que los carbohidratos no estructurales se acumulan por encima de las demandas de crecimiento. Este exceso de carbohidratos está disponible para aumentar la producción de MS basados en carbono que no contienen nitrógeno, por ejemplo, los compuestos fenólicos y los terpenos (Mooney 1972; Chapin 1980; Bryant *et al.*, 1983) es decir, cuando el crecimiento de las plantas es limitado por nutrientes tienden a aumentar las concentraciones de metabolitos secundarios (Gershenzon, 1984).

La limitación de luz conduce a una menor fotosíntesis y, como resultado, la disminución de las concentraciones de carbono, es decir, la disminución en la tasa de crecimiento es mayor que la disminución en la absorción de los nutrientes, por lo que la absorción de nitrógeno se acumula por encima de los niveles necesarios. En estas condiciones aumenta las concentraciones de MS que contienen nitrógeno (Chapin, 1980; Bryant *et al.*, 1983; Bryant *et al.*, 1992). En cuanto a la leve limitación hídrica, las plantas tienden a cerrar los estomas lo que repercute en la actividad fotosintética, como consecuencia se sintetizan compuestos reducidos como isoprenoides, fenoles o alcaloides sin embargo, la sequía severa puede provocar un declive. Esta variación puede indicar que la sequía leve reduce el crecimiento más que la fotosíntesis, mientras que la limitación severa del agua da como resultado una disminución relativamente mayor en la fotosíntesis que en el crecimiento (Cuivenor, 1973; Selmar y Kleinwächter, 2013).

No todos los MS se producen de igual manera en respuesta al estrés de las plantas, esto puede deberse al suministro de sustrato que afecte la producción de los productos metabólicos; la producción de glucósidos, fenólicos, monoterpenos, y diterpenos se ve menos afectada por la limitación de nutrientes o limitación de la luz, en comparación con la de taninos o triterpenos que se depositan en la superficie de las plantas (Bryant *et al.*, 1992).

1.4 Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son causadas por agentes patógenos como bacterias, virus, parásitos u hongos. Estas enfermedades pueden transmitirse, directa o indirectamente, de una persona a otra y están estrechamente relacionadas con los determinantes sociales de la salud (OMS, 2016).

En México, a partir del siglo XX, se han reportado cambios epidemiológicos de las enfermedades, por cambios ambientales, demográficos, económicos, sociales, culturales y avances en la atención a la salud que han influenciado en el perfil de las enfermedades. En la primera mitad del siglo, la población estaba expuesta a los problemas de un país en desarrollo, caracterizada por falta de higiene, mala disposición de residuos, agua no potable, hacinamiento, esquemas de vacunación incompletos, infraestructura insuficiente de servicios de salud (Soto-Estrada *et al.*, 2016). Sin embargo, actualmente se registra el 46.6% de pobreza a nivel nacional, donde la atención primaria de salud se basa en la medicina tradicional por tradición cultural por falta de recursos económicos (Coneval, 2016; OMS, 2004).

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) forman parte de las enfermedades causadas por agentes patógenos (virus, hongos y bacterias) que afectan algún punto del sistema respiratorio, son la principal causa de morbilidad y de asistencia a los servicios de salud. En México es uno de los problemas prioritarios, por mantenerse entre las diez principales causas de mortalidad en la población (SSa, 2013). De igual manera, las enfermedades gastrointestinales son un problema de salud pública al que se enfrentan los países en desarrollo, afectan principalmente a la población infantil y su ocurrencia depende del nivel socioeconómico de los pacientes (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2011).

La demanda de productos naturales de interés farmacéutico derivados de plantas se ha incrementado dada la limitación de obtención de medicamentos basados en la síntesis química (Pezzuto, 1995). Es por eso que las plantas son un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, ya que se

utilizan para satisfacer necesidades de atención primaria de salud (Coneval, 2016; OMS, 2016).

1.4.1 Resistencia bacteriana

El perfil de enfermedades infecciosas está cambiando, y se observan variaciones dramáticas en la sociedad y el medio ambiente, una de ellas es la resistencia a los antimicrobianos. En el siglo XX, el descubrimiento de los antibióticos, con la penicilina por Fleming, se convirtió en la solución a las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso indiscriminado de los antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen es el factor más importante que contribuye al surgimiento de diversas clases de resistencia bacteriana (Ang *et al.*, 2004), que se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras de las mismas especies (Alós, 2015).

Las bacterias tienen mecanismos biológicos para adecuarse a diversas presiones ambientales, aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y disgregación de esta característica inherente (Hart, 1998; Cabrera *et al.*, 2007).

La resistencia bacteriana se divide en una base genética intrínseca (natural) y una adquirida. La resistencia natural está dada por un mecanismo permanente determinado genéticamente por cepas de una misma especie bacteriana y sin relación con la dosis del antibiótico; la resistencia adquirida, es una característica propia de cada especie bacteriana, que es sensible por naturaleza pero que ha sido modificada genéticamente, ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones) (Tello *et al.*, 2011; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013).

La relación entre el uso de los antibióticos y el desarrollo de resistencia se basan en los datos de tendencia histórica de variaciones de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que indican que los valores CMI₉₀ (que inhibe un 90% el

crecimiento bacteriano) son mayores en la actualidad que en el momento que se descubrió el compuesto considerado (Martínez-Martínez y Calvo, 2010).

La resistencia bacteriana se incrementa de manera constante, no solo en los tratamientos para el humano, sino también en otras áreas, como la veterinaria, en la agricultura o en situaciones más singulares, como en los tratamientos de oleoductos que generan un nicho único de bacterias resistentes. La selección de resistencias en los centro de salud, en la comunidad o en animales tiene un impacto en el resto de los ecosistemas parciales (Martínez-Martínez y Calvo, 2010). Además, desde hace dos décadas ha disminuido gradualmente la capacidad de los antibióticos de inhibir el crecimiento bacteriano, esto determina un aumento en la tasa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas, tanto en países más avanzados como en los de en desarrollo (Oromí, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2017 reveló que mundialmente los niveles de resistencia de algunas infecciones bacterianas graves son elevados. Las bacterias resistentes más frecuentes son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp.* Así mismo, se publicó la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana (cuadro 1) (OMS, 2017).

Cuadro 1. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.

Prioridad 1: Critica	Prioridad 2: Elevada	Prioridad 3: Media
<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a los carbapenémicos.	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a vancomicina.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , sin sensibilidad a la penicilina.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a los carbapenémicos.	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina.	<i>Hemophilus influenzae</i> resistentete a penicilina.
Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL.	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a claritromicina. <i>Campylobacter spp.</i> , resistente a las fluoroquinolonas. <i>Salmonella spp.</i> , resistentes a las fluoroquinolonas. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a cefalosporina y a las fluoroquinolonas.	<i>Shigella spp.</i> , resistente a las fluoroquinolonas.

ESBL: Betalactamasas de espectro extendido.

Independientemente de la base genética natural o adquirida de las bacterias, los mecanismos de resistencia se clasifican en tres aspectos básicos de acuerdo con el mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico los cuales son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad (Giedraitien *et al.*, 2011).

1.5 Familia Burseraceae

La familia Burseraceae es conocida por producir resinas de valor económico, medicinal y cultural, como el incienso, mirra y copal; pertenece al orden Sapindales, que es parte del grupo monofilético de las plantas con flores que tienen polen tricolpado y comprende 18 géneros. La familia está dividida en tres tribus: Canarieae, Protieae y Bursereae, distribuidas en América tropical, África, Ceilán,

Madagascar, Arabia, La India y Malasia. Las Burseraceas que son endémicas al país, suman a nivel de género el 20% y a nivel de especie el 80% (Mabberley, 1987; Rzedowski *et al.*, 2005; Weeks *et al.*, 2005).

Las especies de la familia Burseraceae representan uno de los componentes florísticos y estructurales principales de los bosques tropicales caducifolios (selva baja caducifolia) del occidente de México, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, mientras que, por la vertiente del Océano Pacífico, de Sonora a Chiapas donde predominan los bosques tropicales caducifolios, hay más de 50 especies de *Bursera* (Cházaro *et al.*, 2011).

1.6 Antecedentes de estudios sobre la tribu Bursereae

Dentro de la tribu Bursereae se incluyen los géneros *Commiphora*, *Aucoumea*, *Boswellia*, *Triomma*, *Garuga*, *Bursera* y *Beiselia* (Weeks *et al.*, 2005), este último es un género monotípico que incluye únicamente a la especie *Beiselia mexicana*.

El género *Bursera* es uno de los más estudiados, en antecedentes fitoquímicos se ha reportado que los aceites esenciales de las especies del género *Bursera* les proporciona aroma a las plantas (García-Barriga, 1992; Martínez, 1996), así mismo, estudios donde se evaluó la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria en especies del género mencionado han mostrado eficacia; según Robles *et al.* (2005) el aceite esencial de *B. graveolens* está constituido por monoterpenos y sesquiterpenos, además el extracto etanólico mostró actividad antibacteriana sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto metanólico de *B. morelensis* tuvo actividad antimicrobiana, antifúngica y antiinflamatoria, estos efectos fueron atribuidos a los compuestos fenólicos (fenilpropanoides, flavonoides y taninos hidrolizables) (Hernández *et al.*, 2015). Por otra parte, Salinas *et al.* (2009) reportaron actividad antimicrobiana de *B. copallifera* del extracto metanólico y de los extractos hexánico y acetónico de *B. grandifolia* contra *S. aureus* y *S. faecalis*. Por lo mencionado, es evidente que las especies de la tribu Bursereae tienen potencial antimicrobiano (cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad biológica de algunas especies de la tribu Bursereae.

Especie	Extracto	Parte de la planta	Actividad Biológica	Referencia
<i>B. graveolens</i>	Acetónico	Hoja	Antibacteriana	Robles <i>et al.</i> , 2005
	Etanólico		Antibacteriana y antiinflamatoria	
	Acetato de etilo	Corteza	Antibacteriana	
	Etanólico		Antibacteriana y antiinflamatoria	
	Acetato de etilo		Antibacteriana	
<i>B. morelensis</i>	Metanólico	Corteza	Antibacteriana, antiinflamatoria y antifúngica	Hernández <i>et al.</i> , 2015
<i>B. copallifera</i>	Hexánico, acetónico y metanólico	Hojas	Antibacteriana y antifúngico	Salinas <i>et al.</i> , 2009
	Hexánico, acetónico y metanólico	Tallo	Antibacteriana y antifúngico	
<i>B. grandifolia</i>	Hexánico, acetónico y metanólico	Hojas	Antibacteriana y antifúngico	Salinas <i>et al.</i> , 2009
	Hexánico, acetónico y metanólico	Tallo	Antibacteriana y antifúngico	
<i>B. serrata</i>	Etanólico	resina	Antibacteriana	Raja <i>et al.</i> , 2011; Weckesser <i>et al.</i> , 2007
<i>B. simaruba</i>	Etanólico	Hojas	Antibacteriana	Rojas y Rodríguez, 2008
<i>B. elongata</i>	Clorofórmico metanólico y acuoso	Corteza	Antibacteriana	Mothan y Lindequist, 2005
<i>B. ameero</i>	Clorofórmico, metanólico y acuoso	Corteza	Antibacteriana	Mothan y Lindequist, 2005
<i>C. parvifolia</i>	Clorofórmico, metanólico y acuoso	Corteza	Antibacteriana	Mothan y Lindequist, 2005

Además de lo mencionado, se ha reportado variación en la producción de compuestos en algunas especies de la tribu Bursereae, tales como el trabajo realizado por Nolasco, quien en 2014 reportó la variación significativa de la producción de compuestos de *B. morelensis* en la época de sequía y de lluvias. El autor mencionó que la especie presentó mayor acumulación de compuestos no polares en las ramas colectadas en la temporada seca, en comparación con la temporada de lluvias. Así mismo, hubo mayor diversidad de flavonoides en los extractos acetónicos y metanólicos obtenidos de las hojas, y en los extractos metanólicos de la corteza.

Por otra parte, en el aceite esencial de *Aucoumea klaineana* se ha identificado principalmente monoterpenos (Koudou *et al.*, 2009; Jazet *et al.*, 2010) y triterpenos en el extracto hexánico de las hojas de *B. simaruba* (Carretero *et al.*, 2008)

1.7 *Beiselia mexicana* (Forman)

Beiselia mexicana, conocida comúnmente como “Copal de piedra” (apéndice I), es un árbol o arbusto dioico de hasta 8-10 m de altura (figura 1) (Forman, 1989), se encuentra en crestas rocosas calizas, a 360-680 msnm (COFEMER, 2015). La especie representa un grupo basal de la familia Burseraceae (Thulin *et al.*, 2008) y ha sido descrita y ubicada únicamente en el bosque tropical caducifolio de la localidad de Aquila, en el estado de Michoacán (México) (COFEMER, 2015), donde la temporada de lluvias ocurre de junio a octubre, con rangos de temperatura 20.7 a 40.5°C y en temporada seca el rango de temperatura es de 16.9 a 40.1°C, la precipitación anual registrada es de 598 mm (Martínez, 2016)

B. mexicana es utilizada en ceremonias religiosas y como remedio medicinal para tratar dolores lumbares y reumáticos, enfermedades bronco-respiratorias, problemas circulatorios, tuberculosis y para reforzar el sistema inmunológico. Se utiliza principalmente la resina y la corteza; la resina se aplica de forma directa en el área afectada como compresa, o se aspiran los vapores, la corteza es hervida y tomada como infusión o agua de uso (Martínez, 2016).



Figura 1. Árbol y corteza de *Beiselia mexicana* (Imagen tomada de Naturalista, CONABIO, 2013).

De la especie *B. mexicana* no existen estudios poblacionales y los trabajos de campo son escasos, de ellos solamente se tienen registradas siete colectas en herbarios, sin embargo, actualmente hay una producción de la especie para satisfacer la demanda de los coleccionistas de suculentas (COFEMER, 2015). Por otra parte, Martínez en el 2016 reportó la respuesta germinativa de la especie *ex situ* para determinar los requerimientos básicos de germinación en condiciones controladas, para su estudio consideró la viabilidad en tiempos diferentes de almacenamiento. Además de lo mencionado, no hay ningún informe o investigación

referente a la actividad farmacológica de la especie, por lo que con el presente estudio se pretende avalar su uso medicinal como antimicrobiano y conocer su composición química, con lo cual se contribuirá al conocimiento de las especies de la familia Burseraceae y, en especial, al conocimiento de *B. mexicana*, que es una especie endémica y de importancia económica para los habitantes de la localidad de Aquila, en Michoacán.

2. Pregunta científica

Las plantas tienen mecanismos de defensa estructurales y compuestos químicos que las protegen contra herbívoros y agentes patógenos ¿Los extractos de la corteza de la especie *B. mexicana* presentarán actividad antimicrobiana contra agentes infecciosos de interés en salud pública en diferentes temporadas?

3. Hipótesis

Las especies de la familia Burseraceae poseen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, entre ellos terpenos y compuestos fenólicos, estos se biosintetizan en respuesta a los factores físicos, químicos y biológicos con los que interactúan las especies. *B. mexicana* pertenece a la familia Burseraceae y es utilizada para tratar padecimientos respiratorios e infecciosos, por lo que se espera que la especie presente actividad antimicrobiana y que tal efecto muestre variación en individuos colectados en distintas temporadas (seca y lluviosa).

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

- Determinar y comparar el efecto antimicrobiano de *Beiselia mexicana* colectada en temporada seca y de lluvias.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos hexánico, acetónico y metanólico de la corteza de *B. mexicana* colectada en las temporadas seca y de lluvias.
- Caracterizar cualitativamente la composición química de los extractos.
- Evaluar cualitativa y cuantitativamente el efecto antibacteriano y antifúngico de los extractos.
- Obtener la cinética de crecimiento en la población bacteriana más susceptible a los extractos.
- Comparar la composición química cualitativa de la especie colectada en dos temporadas del año y relacionarla con la actividad antimicrobiana que presenta.

5. Materiales y métodos

5.1 Obtención y caracterización de los extractos

5.1.1 Colecta del material vegetal

Para el presente estudio se llevaron a cabo dos colectas de la corteza de *B. mexicana*, en la localidad de Aquila (Michoacán, México) ubicada a 18°36' latitud norte y 103°30' longitud oeste (figura 2). Las colectas se realizaron en dos épocas del año: temporada de lluvias (septiembre de 2016) y temporada seca (noviembre de 2016). Un ejemplar de la especie se depositó en el Herbario IZTA de la FES-Iztacala para su identificación taxonómica y obtención del número de registro.



Figura 2. Ubicación geográfica de Aquila, Michoacán. (Imagen tomada de Naturalista CONABIO, 2018).

5.1.2 Preparación de los extractos

Para la obtención de los extractos se tomaron 290 y 265 g de la corteza seca y triturada, colectada en las temporadas de lluvias y seca respectivamente. Se obtuvieron los extractos hexánico, acetónico y metanólico mediante la técnica de maceración (Domínguez, 1979) (apéndice II). Los extractos líquidos se filtraron y se concentraron por destilación a presión reducida, se permitió la evaporación total del solvente y se determinó su rendimiento por diferencia de peso entre los extractos sólidos obtenidos y el material vegetal de partida. Los resultados se reportaron en gramos y porcentaje.

5.1.3 Pruebas fitoquímicas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos.

La determinación los principales componentes se realizó aplicando pruebas fitoquímicas (Domínguez, 1979), estas pruebas fueron aplicadas para detectar la presencia de fenoles (taninos, cumarinas y flavonoides), terpenos (monoterpenos, triterpenos y esteroides), glucósidos (saponinas) y alcaloides (apéndice III).

5.2 Actividad antimicrobiana

5.2.1 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó sobre 9 cepas de bacterias Gram positivas y 10 Gram negativas (cuadro 3).

Cuadro 3. Cepas bacterianas utilizadas para los bioensayos.

<i>Enterobacter aerogenes</i> **	<i>S. typhi</i> **
<i>E. gergoviae</i> **	<i>Serratia marcescens</i> **
<i>Enterococcus faecalis</i> *	<i>Staphylococcus aureus</i> 23MR*
<i>Eschericia coli</i> 82MR**	<i>S. aureus</i> ATCC 29213*
<i>E. coli</i> CUSI**	<i>S. aureus</i> cc*
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724**	<i>S. aureus</i> CUSI*
<i>K. penumoniae</i> ATCC 13883**	<i>S. aureus</i> FES-C*
<i>Micrococcus luteus</i> *	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	<i>S. epidermidis</i> FES- C*
<i>Salmonella enterica</i> **	

*, Gram positiva; ** Gram negativa.

- **Evaluación cualitativa**

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos se utilizó el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (apéndice IV) (Koneman *et al.*, 2006) para determinar las bacterias más susceptibles a los extractos, los cuales inhiben el crecimiento de los microorganismos al difundirse en el medio de cultivo Müeller-Hinton.

Se prepararon discos estériles de papel filtro de 5 mm de diámetro que fueron impregnados con 2 mg de los extractos. Para los controles positivos se impregnaron discos con 25 µg de cloranfenicol, para los controles negativos se impregnaron discos con 10 µL del solvente correspondiente (hexano, acetona y metanol).

A partir de los cultivos de microorganismos, se preparó el inóculo ajustándolo a una turbidez igual a la del tubo 0.5 de la Escala de McFarland, que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL (Bailey *et al.*, 1987).

Cada inóculo se sembró masivamente en la superficie seca de placas de agar Müeller-Hinton, las placas se dejaron reposar de 3 a 5 minutos. Después se colocaron los sensidiscos con ayuda de pinzas estériles. Posteriormente se procedió a la incubación a 37 °C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de los microorganismos. Cada bioensayo se realizó por triplicado.

- **Evaluación cuantitativa**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos sobre las cepas bacterianas, se utilizó el método modificado de dilución en agar (apéndice V) (Koneman *et al.*, 1985).

Las concentraciones utilizadas para los bioensayos fueron de 0.25 a 3.0 mg/mL de los extractos, las cuales se incluyeron en micro placas de 96 pozos. A cada pozo se le adicionaron por triplicado 50 µL del inóculo microbiano (1×10^5 UFC/mL). Como control negativo se prepararon pozos con alícuotas de los

solventes utilizados, y como control positivo pozos con diferentes concentraciones de cloranfenicol (1 a 15 µg/mL).

Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y posteriormente se determinó la CMI la cual fue la concentración en donde se observó una disminución drástica del crecimiento microbiano. La CBM fue la concentración en la que ya no se observó crecimiento microbiano.

- **Cinética de crecimiento en la población bacteriana**

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la cinética de crecimiento en la población bacteriana (apéndice VI) (Método modificado por Ávila, 1996), para cada extracto se utilizó una cepa Gram positiva y una Gram negativa; se monitoreo el crecimiento de las poblaciones al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto (1/2 CMI, CMI y CBM) durante 24 horas.

5.2.2 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los extractos se evaluó sobre tres cepas de hongos levaduriformes y cuatro hongos filamentosos (cuadro 4).

Cuadro 4. Cepas fúngicas utilizadas para los bioensayos

Hongos miceliados	Hongos levaduriformes
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i> 17 MR
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265	<i>C. glabrata</i>
<i>F. sporotrichum</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	

- **Evaluación cualitativa**

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo con el método de cualitativo de inhibición del crecimiento radial (apéndice VII) (Wang y Bun, 2002). Para determinar el efecto inhibitorio de los extractos.

Los ensayos se realizaron en placas Petri (100 x 15 mm) con 20 mL de agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), en el cual se inocularon botones de

5 mm de diámetro del micelio. Se colocaron discos previamente impregnados con 2 mg de extracto, discos con 60 µg de Ketoconazol (control positivo) y discos con 10µL del solvente correspondiente (control negativo) los cuales se dejaron evaporar por 12 h.

Las placas fueron incubadas a 25 ± 1 °C durante 72 h hasta que el crecimiento micelial se desarrolló. Los resultados se reportaron como positivo o negativo, tomando en cuenta la inhibición del crecimiento radial del hongo, lo cual es evidente por la formación de zonas de inhibición similares a medias lunas alrededor de los sensidiscos. Cada bioensayo se realizó por triplicado.

Para evaluar la actividad antifúngica de los extractos sobre los hongos levaduriformes se utilizó el método de difusión en agar Kirby-Baüer (apéndice IV) (Koneman *et al.*, 2006), los bioensayos se realizaron de la misma forma que para bacterias, sin embargo, en estos ensayos para el control positivo se impregnaron sensidiscos con 30 µg de Nistatina y para los controles negativos se impregnaron discos con 10µL del solvente correspondiente (hexano, acetona y metanol).

- **Evaluación Cuantitativa**

El ensayo sobre hongos miceliados se llevó a cabo mediante el método de dilución en agar en hongos miceliados (Wang y Bun, 2002) (apéndice VIII) en cajas de 24 pozos, cada pozo contenía 1.5 mL de agar PDA en la que se incluyeron por triplicado una serie de concentraciones (0.25 a 4.0 mg/mL). En el centro de cada pozo se colocó el inóculo fúngico que consistió en 1 mm de diámetro de micelio.

Las placas fueron incubadas a 28°C durante 72 horas, hasta que el crecimiento micelial se desarrolló. Pasado el tiempo de incubación, se midió el diámetro de crecimiento de micelio.

Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la concentración fungicida mínima (CFM). Además, se determinó la CF₅₀ mediante un análisis de regresión, al graficar

las concentraciones y el porcentaje de inhibición mostrado por el extracto. Cada bioensayo se llevó a cabo por triplicado.

Por otra parte, para los hongos levaduriformes, la determinación cualitativa se realizó de la misma forma que para bacterias, mediante el método de dilución en agar (apéndice V), en este caso se utilizó como medio de cultivo caldo Sabouraud y con los resultados se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM), esta última corresponde con la concentración en la que ya no se observó crecimiento microbiano en los pozos experimentales.

5.3 Análisis estadísticos

Para conocer las diferencias y similitudes en el efecto antimicrobiano de los extractos se realizó un ANOVA multifactorial, para ello se tomaron como factores las temporadas de colecta, los extractos, y las concentraciones. Además, para determinar la CF_{50} en los ensayos con hongos miceliados se realizaron análisis de regresión logarítmica para lo cual se empleó el software Excel 2013.

6. Resultados

6.1 Obtención y caracterización de los extractos

6.1.1 Datos etnobotánicos de *B. mexicana*

Cuadro 5. Datos generales de *B. mexicana*.

Familia	Buseraceae
Nombre científico	<i>Beiselia mexicana</i> Forman
Nombre común	Copal de piedra
Número de registro	3218 *
Parte utilizada	Corteza
Forma de uso	Infusión o agua de uso
Fecha de colecta	Septiembre y noviembre de 2016
Lugar de colecta	Mpio. Aquila, "La Virgencita" límites entre las localidades de Ostula y Aquila, Michoacán (México).
Coordenadas	18°36'52.97" N y 103°29'2.97" O
Altitud	614 msnm
Colector	Biól. Carlos Verdía Guzmán

*N° de registro de *B. mexicana* proporcionado por el Herbario de la Fes Iztacala.

6.1.2 Extracción

Los extractos metanólicos fueron los más abundantes con 60.00 y 25.48 g de las temporadas de lluvias y seca, correspondientes a 20.69 y 9.62% respectivamente (cuadro 6). El menor rendimiento lo presentó el extracto acetónico (temporada de lluvias), con 0.25%, y el extracto hexánico (temporada seca) con 1.62%.

Cuadro 6. Rendimiento de los extractos de la corteza de *B. mexicana* colectada en la temporada de lluvias y seca.

Colecta Temporada	Extracto	(g)	(%)
Lluvias	Hexánico	5.70	1.78
	Acetónico	0.74	0.25
	Metanólico	60.00	20.69
Seca	Hexánico	4.28	1.62
	Acetónico	11.71	4.42
	Metanólico	25.48	9.62

El rendimiento en g se determinó con respecto a 290 y 265 g de corteza seca y fragmentada, para las colectas de la temporada de lluvias y seca, respectivamente.

6.1.3 Pruebas fitoquímicas de los extractos

Las pruebas de identificación de los grupos de metabolitos secundarios, el extracto metanólico de la corteza colectada en la temporada seca resultaron positivas para todos los grupos principales de metabolitos secundarios, excepto alcaloides (cuadro 7), el extracto acetónico presentó flavonoides, el hexánico glucósidos y monoterpenos. En ambos extractos las pruebas fueron positivas para esteroides. De igual manera, los terpenos se encontraron en los tres extractos de la corteza colectada en la temporada de lluvias. Además, el extracto metanólico presentó taninos, mientras que el extracto acetónico dio pruebas positivas para flavonoides y esteroides.

Cuadro 7. Principales grupos de metabolitos secundarios (MS) en los extractos de *B. mexicana*.

MS	Temporada de lluvias			Temporada Seca		
	Hexánico	Acetónico	Metanólico	Hexánico	Acetónico	Metanólico
Fenoles						
✓ Prueba general	+	+	+	-	-	+
✓ Taninos	-	-	+	-	-	+
✓ Cumarinas	-	-	-	-	-	-
✓ Flavonoides	-	+	-	-	+	-
Terpenos						
✓ Prueba general	+	+	+	+	+	+
✓ Triterpenos	-	-	-	-	-	-
✓ Esteroides	+	+	-	+	+	+
✓ Monoterpenos	+	+	+	+	-	-
Glucósidos						
✓ Prueba general	-	-	-	+	-	+
✓ Saponinas	-	-	-	-	-	+
Alcaloides						
✓ Prueba general	-	-	-	-	-	-

6.2 Actividad antimicrobiana

6.2.1 Actividad antibacteriana

- **Evaluación cualitativa**

Todos los extractos de *B. mexicana* mostraron actividad antibacteriana sobre al menos tres cepas bacterianas. Los extractos de ambas temporadas inhibieron seis cepas bacterianas Gram positivas, mientras que los extractos de la temporada seca impidieron el crecimiento de cuatro cepas Gram negativas; dos cepas más que los extractos de la temporada de lluvias. Sin embargo, los extractos metanólicos y acetónicos inhibieron un mayor número de cepas, en comparación con los hexánicos (cuadro 8).

De los extractos de la corteza colectada en la temporada seca, el extracto metanólico fue el más activo al inhibir el crecimiento bacteriano de nueve cepas (cinco Gram-positivas y cuatro Gram-negativas) mostrando mayores halos de inhibición (entre 6.00 y 12.33 mm), por otra parte, el extracto más eficaz de la temporada de lluvias fue el extracto acetónico, el cual mostró actividad sobre seis cepas bacterianas (cuatro Gram-positivas y dos Gram negativas), con halos de inhibición entre 4.33 y 8.00 mm. Los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de ambas temporadas presentaron diferencias significativas comparadas con el control ($p < 0.5$).

Cuadro 8. Actividad antibacteriana de los extractos de *B. mexicana*: comparación por temporada de colecta.

Microorganismos	Control positivo (Cloranfenicol)	Temporada de lluvias			Temporada seca		
		Hexánico	Acetónico	Metanólico	Hexánico	Acetónico	Metanólico
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506 ⁺	16.00 ± 0.82	Na	Na	Na	Na	8.00 ± 0.00	9.00 ± 1.00
<i>M. luteus</i> ATCC 10240a ⁺	32.00 ± 0.00*	7.00 ± 0.00	Na	Na	Na	11.33 ± 0.57	12.33 ± 1.53
<i>S. aureus</i> 23MR ⁺	22.33 ± 0.47*	Na	Na	6.00 ± 0.00	7.33 ± 0.57	7.33 ± 0.57	9.66 ± 0.57
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ⁺	20.00 ± 0.00*	Na	8.00 ± 1.00	10.00 ± 1.00	Na	Na	Na
<i>S. aureus</i> cc ⁺	16.33 ± 0.47*	6.00 ± 0.00	7.33 ± 0.57	10.66 ± 1.15	Na	Na	Na
<i>S. aureus</i> FES-C ⁺	22.33 ± 0.00*	Na	6.66 ± 1.15	Na	7.33 ± 0.57	7.00 ± 0.00	10.33 ± 0.57
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 ⁺	18.00 ± 0.81*	Na	8.00 ± 0.00	10.66 ± 1.15	Na	10.66 ± 15	Na
<i>S. epidermidis</i> FES-C ⁺	Nd	Na	Na	Na	Na	Na	7.00 ± 0.00
<i>E. coli</i> CUSI ⁻	23.00 ± 0.00	Na	Na	Na	Na	Na	8.66 ± 0.58
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 ⁻	27.00 ± 0.00*	6.66 ± 0.57	6.50 ± 0.70	6.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	6.66 ± 0.57	6.00 ± 0.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ⁻	Nd	Na	8.00 ± 1.00	Na	8.00 ± 1.00	7.00 ± 0.00	9.66 ± 0.58
<i>S. tiphy</i> ATCC 19430 ⁻	19.33 ± 0.47	Na	Na	Na	Na	Na	6.0 ± 0.00

Halos de inhibición en mm. Valores promedio de tres repeticiones ± DE. Los sensibilizados se probaron con 2 mg de extracto. Control positivo: sensibilizados con 25µg de cloranfenicol. *Estadísticamente significativo (p < 0.05). Na: no presento actividad. Nd: no determinado; + Gram positiva; - Gram negativa.

- **Evaluación cuantitativa**

En la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana, los extractos de la corteza colectada en la temporada seca fueron más activos ya que, el extracto metanólico mostró los menores valores de CMI (cuadro 9). Las cepas más susceptibles al extracto metanólico fueron *M. luteus* ATCC 10240 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, al mostrar valores de CIM de 0.25 mg/mL y CBM mayores 3 mg/mL. Para el extracto acetónico, *E. faecalis* ATCC 14506 fue la más susceptible ya que su crecimiento fue inhibido con concentraciones de 0.25 y 0.75 mg/mL para CIM y CBM, respectivamente. El extracto hexánico fue el menos activo, ya que mostró valores de CIM y CBM mayores a 3 mg/mL en todas las cepas bacterianas susceptibles.

En cambio, se observó menor efecto inhibitorio en los extractos de la corteza colectada en la temporada de lluvias, ya que inhibió un menor número de cepas bacterianas (8 cepas) y los valores de CMI y CBM fueron mayores (cuadro 10) en comparación con los extractos de la corteza obtenida en la temporada seca. En este caso, las cepas más susceptibles al extracto acetónico fueron *S. aureus* cc, *S. aureus* 23MR y *S. aureus* ATCC 29213 con 3mg/mL de CIM.

Cuadro 9. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos de *B. mexicana* colectada en la temporada seca

Microorganismos	Extracto					
	Hexánico		Acetónico		Metanólico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>M. luteus</i> ATCC 10240a ⁺	Na	Na	Nd	Nd	0.25	>3.00
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506 ⁺	Na	Na	0.25	0.75	>3.00	>3.00
<i>S. aureus</i> 23MR ⁺	>3.00	>3.00	3.00	>3.00	0.5	>3.00
<i>S. aureus</i> FES-C ⁺	Nd	Nd	Nd	Nd	0.75	>3.00
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 ⁺	Na	Na	Nd	Nd	Na	Na
<i>S. epidermidis</i> FES-C ⁺	Na	Na	Na	Na	>3	>3.00
<i>E. coli</i> CUSI ⁻	Na	Na	Na	Na	>3	>3
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 ⁻	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00	3.00	>3.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ⁻	>3.00	>3.00	3.00	>3.00	0.25	>3.00
<i>S. typhi</i> ATCC 19430 ⁻	Na	Na	Na	Na	Nd	Nd

Datos expresados en mg/mL. Na: no presentó actividad. Nd: no determinado; + Gram positiva; - Gram negativa

Cuadro 10. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extracto de *B. mexicana* colectada en la temporada de lluvias

Microorganismos	Extracto					
	Hexánico		Acetónico		Metanólico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>M. luteus</i> ATCC 10240a ⁺	>3.00	>3.00	Na	Na	Na	Na
<i>S. aureus</i> 23MR ⁺	Na	Na	Na	Na	>3.00	>3.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ⁺	Na	Na	3.00	>3.00	>3.00	>3.00
<i>S. aureus</i> cc ⁺	>3.00	>3.00	3.00	>3.00	>3.00	>3.00
<i>S. aureus</i> FES-C ⁺	Na	Na	>3.00	>3.00	Na	Na
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 ⁺	Na	Na	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 ⁻	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00	>3.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ⁻	Na	Na	Nd	Nd	Na	Na

Datos expresados en mg/mL. Na: no presentó actividad. Nd: no determinado; + Gram positiva; - Gram negativa.

- **Cinética de crecimiento en la población bacteriana.**

La cinética de crecimiento de la cepa bacteriana *S. aureus* 23 MR se presenta en la figura 3, en donde se observa que el extracto metanólico de la colecta de la temporada de lluvias ejerce efecto bactericida en las concentraciones de 6.0 y 9.0 mg/mL, ya que provocó la muerte del 99.9% de la población bacteriana a las 24 h de haber aplicado las concentraciones mencionadas (figura 3a).

Por otra parte, las concentraciones evaluadas del extracto metanólico (temporada seca) únicamente produjeron un efecto bacteriostático en la población microbiana. En la concentración de 6.0 mg/mL se observa que a partir de las 8 h la población bacteriana se mantiene en una fase estacionaria, es decir, la proliferación se detiene, mientras que la concentración de 0.5 mg/mL desde las 6 h hasta las 24 h aumenta el crecimiento de las UFC, no obstante, el número de sobrevivientes disminuye un 15% respecto al control (figura 3b).

La curva de crecimiento de la cepa *K. pneumoniae* se muestra en la figura 4, donde se observa que el crecimiento bacteriano disminuyó 33% con todas las concentraciones usadas del extracto metanólico de la colecta de la temporada de lluvias, después de las 24 h, respecto al control (figura 4a). Sin embargo, el extracto

metanólico de la colecta de la temporada seca redujo el 99.9% del crecimiento bacteriano con la concentración de 9 mg/mL a las 12 h después de su aplicación, en tanto, con la concentración de 6 mg/mL se produjo el mismo efecto bactericida, pero a las 24 h después de la aplicación del extracto, la concentración de 3 mg/mL redujo el 34% del crecimiento de la cepa bacteriana a las 24 h (figura 4b).

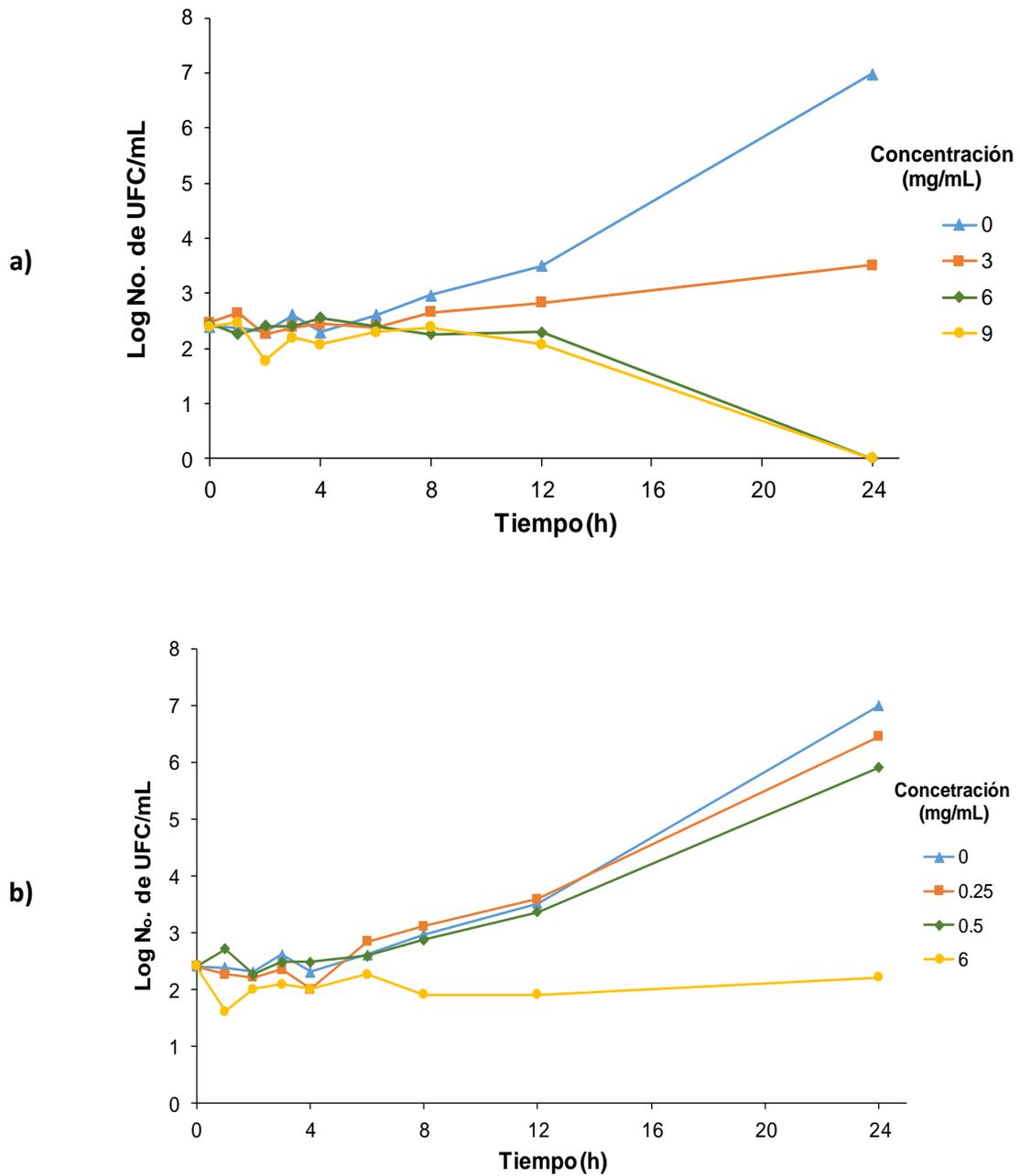


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones del extracto metanólico sobre el crecimiento en la población bacteriana sobre *S. aureus* 23 MR. a) Extracto metanólico de *B. mexicana* colectada en temporada de lluvias. b) Extracto metanólico de *B. mexicana* colectada en temporada seca. UFC: unidades formadoras de colonias.

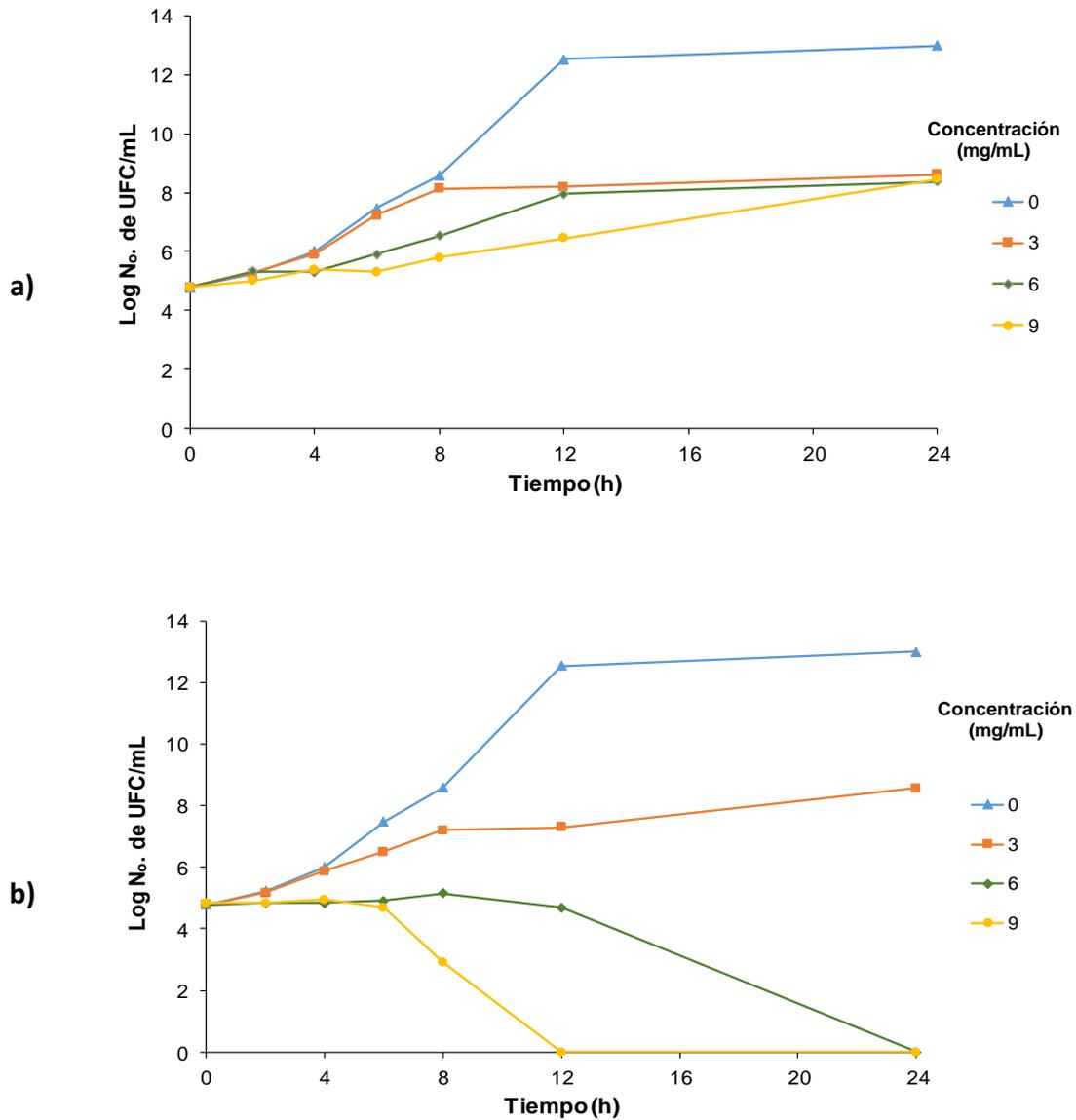


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones del extracto metanólico sobre el crecimiento en la población bacteriana sobre *K. pneumoniae* a) Extracto metanólico de *B. mexicana* colectada en la temporada de lluvias. b) Extracto metanólico de *B. mexicana* colectada en la temporada seca. UFC: unidades formadoras de colonias.

6.2.2 Actividad antifúngica

• Evaluación cualitativa

En la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica, los extractos de la colecta de la temporada seca fueron los más activos al inhibir un mayor número de cepas fúngicas (4 cepas de hongos miceliados), en comparación con los de la colecta de la temporada de lluvias que inhibieron únicamente dos cepas (cuadro 11).

T. mentagrophytes fue susceptible a los extractos acetónico y metanólico (temporada de lluvias); y *A. niger* mostró susceptibilidad a los tres extractos de *B. mexicana* colectada en la temporada de lluvias. En cuanto a los extractos de la colecta en la temporada seca, el crecimiento radial de *T. mentagrophytes* fue inhibido por el extracto hexánico y metanólico; mientras que en *A. niger* y *F. moniliforme* su crecimiento radial fue inhibido por los extractos metanólico y acetónico, respectivamente. Por último, los tres extractos fueron activos para *F. sporotrichum* (cuadro 11).

Cuadro 11. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de *B. mexicana* sobre hongos miceliados.

Hongo	Temporada de lluvias			Temporada seca		
	Extractos			Extractos		
	Hex	Ace	Met	Hex	Ace	Met
<i>A. niger</i>	+	+	+	-	-	+
<i>F. moniliforme</i> CDBB-265	-	-	-	-	+	-
<i>F. sporotrichum</i>	-	-	-	+	+	+
<i>T. mentagrophytes</i> CDB-H-1112	-	+	+	+	-	+

+ Prueba positiva, - Prueba negativa, Hex: hexánico, Ace: acetónico, Met: metanólico.

• Evaluación cuantitativa

En la evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica, de los extractos de la corteza colectada en la temporada de lluvias, el extracto metanólico presentó mayor actividad sobre *A. niger*, con una CF_{50} de 0.65 mg/mL (cuadro 12), seguido del extracto hexánico, con CF_{50} de 0.93 mg/mL. En cambio, el extracto acetónico mostró una menor actividad, con una CF_{50} de 2.11 mg/mL. Los tres extractos

mostraron valores de CFM mayores a 4.00 mg/mL (figura 5a). En tanto la actividad antifúngica de los extractos sobre *T. mentagrophytes*, el extracto acetónico presentó una CF₅₀ 4.07 mg/mL y el extracto metanólico una CF₂₅ de 5.3 mg/ mL (figura 5b).

Para los extractos de la corteza colectada en la temporada seca, el extracto metanólico tuvo una CF₅₀ de 1.1 mg/ mL sobre *A. niger* (cuadro 12), por otro lado, el extracto acetónico presentó una CF₅₀ de 4.7 mg/ mL sobre *F. moniliforme*, ambos extractos obtuvieron una CFM mayor a 4.00 mg/mL (figura 6).

Cuadro 12. Concentración fungicida media (CF₅₀) de los extractos de *B. mexicana* sobre hongos filamentosos.

Microorganismos	Hexánico		Extractos Acetónico		Metanólico	
	Seca	Lluvias	Seca	Lluvias	Seca	Lluvias
<i>A. niger</i>	-	0.93	-	2.11	1.1	0.65
<i>F. moniliforme</i> CDBB-H-265	-	-	4.7	-	-	-
<i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	-	-	-	4.07	-	*5.03

*CF₂₅ = Concentración fungicida que inhibe el crecimiento radial en un 25%, - no presentó actividad.
Unidades expresadas en mg/ mL.

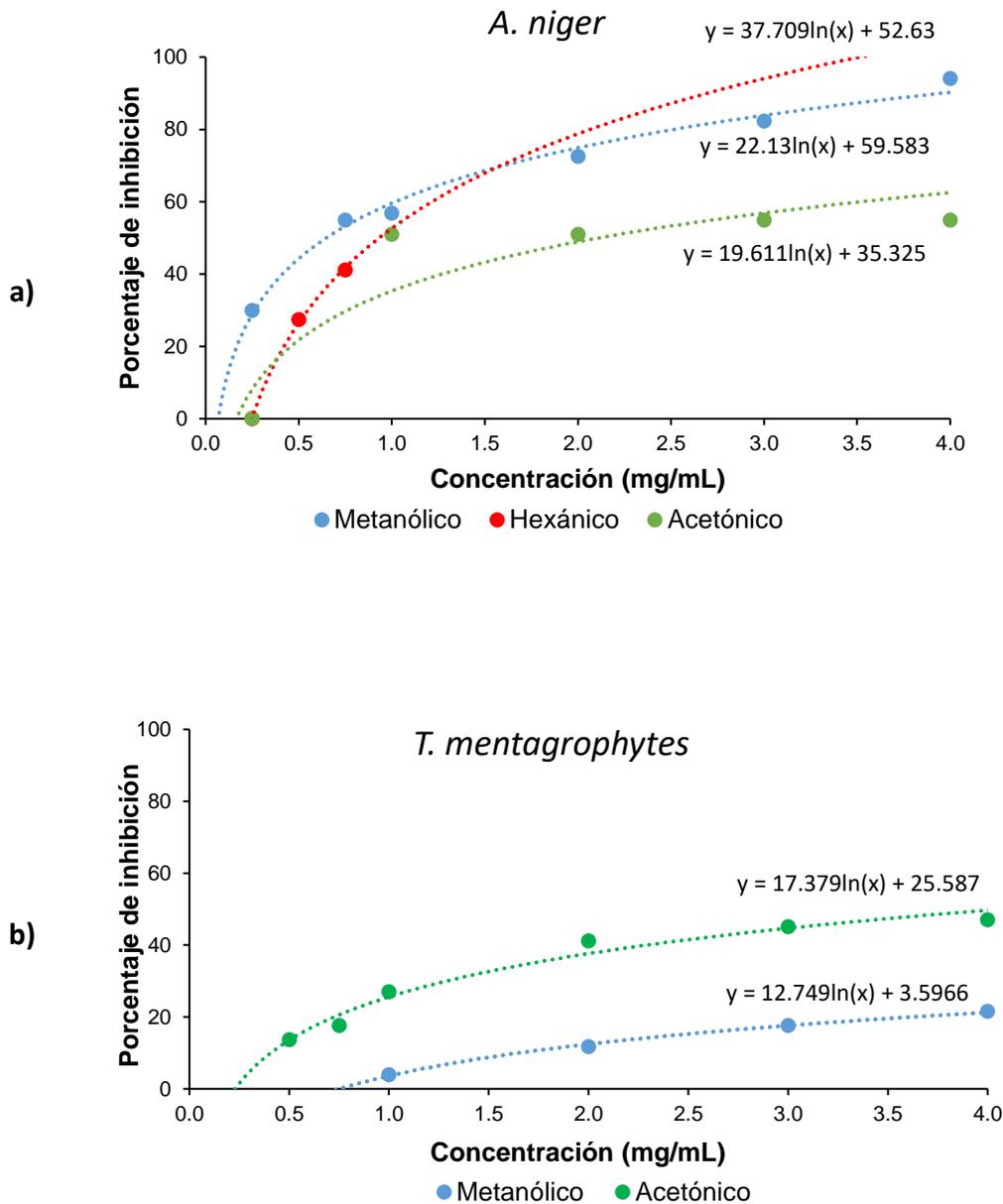


Figura 5. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de *B. mexicana* colectada en la temporada de lluvias. a) Inhibición del crecimiento radial sobre *A. niger*. b) Inhibición del crecimiento radial sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-111

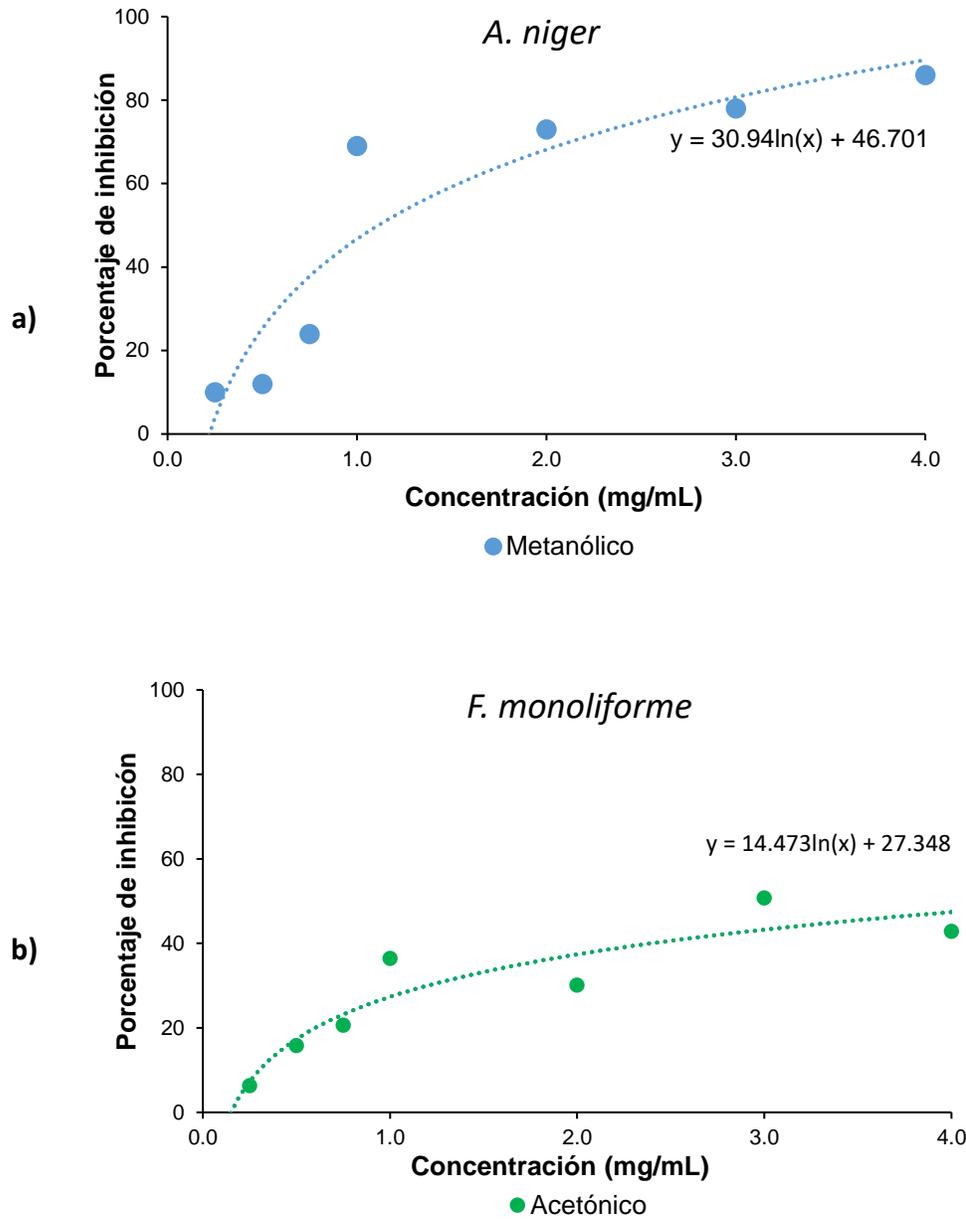


Figura 6. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de *B. mexicana* colectada en la temporada seca. a) Inhibición del crecimiento radial sobre *A. niger*. b) Inhibición del crecimiento radial sobre *F. moniliforme* CDBB-H-265.

7. Discusión

En la actualidad existe un interés creciente en la medicina alternativa para el tratamiento enfermedades que afectan a los seres humanos (Soto *et al.*, 2002). La especie *B. mexicana* resulta de interés en la localidad de Aquila, Michoacán, debido a las propiedades medicinales que se le atribuyen.

De acuerdo con el rendimiento obtenido de los extractos, este varió en los extractos de la corteza obtenida en las dos temporadas, el mayor rendimiento lo presentaron los extractos metanólicos, con 20.69% y 9.62% para la temporada de lluvias y seca respectivamente, lo que indica que la especie acumula una mayor proporción de compuestos polares. Esta diferencia se debe a la variación estacional que afecta la presencia de metabolitos secundarios asociado con factores externos, como el periodo de floración, la temperatura, el suministro de nutrimentos y la intensidad de luz (Hosler y Mikita, 1987), ya que el clima influye en un momento determinado en su crecimiento, desarrollo y en especial en la producción de sus metabolitos secundarios (Acosta, 2003).

La capacidad de las plantas para sintetizar MS, le sirve como mecanismo de defensa contra la depredación de microorganismos, insectos y herbívoros (Muphy, 1999) y para evitar el proceso de enfermedad causado por agentes patógenos (hongos, bacterias, virus y nematodos) y factores abióticos como falta de nutrimentos, agua, radiaciones, sequía, humedad entre otros; es decir, en condiciones ambientales estresantes (Álvarez-Loayza y Terborgh, 2013). *B. mexicana* presentó tres de los cuatro grupos principales de MS, los cuales fueron fenoles, terpenos y glucósidos. En el extracto acetónico de la temporada de lluvias se identificaron flavonoides y esteroides, esto coincide con lo obtenido por otros autores que han reportado resultados similares para otras especies de la familia Burseraceae, principalmente organismos representantes del género *Bursera*, tal es el caso de Suleiman (2014), quien reportó la presencia de flavonoides en el extracto acetónico de la madera del tallo de *C. opobalsamum* y con Moustapha (2014), quien identificó ácidos fenólicos en la corteza de *B. simarumba*. Mientras que para el extracto metanólico de la temporada seca se identificaron saponinas, esteroides y

taninos, lo cual concuerda con Afsar *et al.*, (2012) quien identificó flavonoides, esteroides y saponinas de *B. serrata*. Los flavonoides brindan protección contra la radiación ultravioleta, patógenos y herbívoros; además de que les confiere un efecto importante en la durabilidad de la madera de las plantas arborescentes, ya que las protege contra la colonización de hongos. De la misma manera, los taninos son conservantes naturales y agentes antifúngicos que se encuentran en altas concentraciones en las cortezas (Zucker, 1983; Nascimento, 2013).

El extracto metanólico de la corteza de *B. mexicana* colectada en la temporada seca inhibió el crecimiento bacteriano de nueve cepas, mientras que los extractos acetónico y metanólico (temporada de lluvias) inhibieron el crecimiento de seis cepas bacterianas. Las especies más susceptibles a los extractos fueron *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, los cuales son microorganismos de importancia clínica. *S. aureus* provoca infecciones en la piel, faringoamigdalitis, neumonía, artritis séptica e intoxicación séptica, al igual que *K. pneumoniae*, que causa neumonía, infecciones en la vías urinarias e infecciones en los tejidos blandos. Aunque no hubo informes en la literatura de la actividad antimicrobiana para la especie estudiada, se ha reportado actividad antimicrobiana de especies de la misma tribu, tal es el caso de *B. simaruba*, por ejemplo, Camporese *et al.* (2003) mencionaron que el extracto hexánico de la corteza de la especie mencionada mostró actividad antibacteriana contra *E. coli* y *P. aeruginosa*. Así mismo, Bork *et al.* (1996) reportaron actividad contra *M. luteus*. También Salinas (2009) reportó que el extracto acetónico de *B. copallifera* fue activo contra *S. aureus*.

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) en este trabajo fueron menores para los extractos de *B. mexicana* colectados en temporada seca; el extracto acetónico con 0.25 mg/mL contra *E. faecalis* y el extracto metanólico con 0.25 mg/mL contra *P. aeruginosa* y *M. luteus*. Estas concentraciones pueden ser relativamente altas comparadas con fármacos utilizados para inhibir el crecimiento bacteriano, como el cloranfenicol que inhibe el crecimiento de poblaciones bacterianas en concentraciones de 1 a 4 µg/mL, sin embargo, algunas aplicaciones

tópicas se usan como agentes antibacterianos en una concentración de 0.25% (Camporese *et al.*, 2003).

La actividad antimicrobiana de plantas se atribuye a su composición química, con frecuencia se hace referencia a los compuestos fenólicos (Nychas, 1995), las plantas los sintetizan en respuesta a infecciones microbianas, por lo que se ha encontrado que son sustancias antimicrobianas eficaces contra una amplia gama de microorganismos (Nascimento, 2013). En este sentido, existen estudios que reportan que algunos compuestos fenólicos tienen actividad antibacteriana y presentan valores de CIM similares a los obtenidos en el presente trabajo, como el 2,6-dimetilfenol, con 2.00 mg/mL, y el butil-hidroxitolueno, con 5.00 mg/mL contra *S. mutans* (Greenberg *et al.*, 2008). Por otra parte, Mori *et al.*, en 1987 realizaron un estudio sobre la actividad antibacteriana y el modo de acción de 30 fenoles flavonoideos frente a *S. aureus*, examinaron la relación estructura-actividad de dichos compuestos y comprobaron que los flavonoides que mostraban actividad poseían un grupo hidroxilo libre sobre los anillos A y B, esto respalda la idea de que su objetivo microbiano es la membrana. Sin embargo, varias sustancias tienen un efecto opuesto, es decir, cuanta más hidroxilación, mayor es la actividad antimicrobiana, esto ha sido reflejado para compuestos fenólicos simples (Sato *et al.*, 1996). Así mismo, a los taninos se les atribuye actividad antimicrobiana, su modo de acción puede estar relacionado con su capacidad de desactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras de envoltura nuclear, entre otras (Ya, 1988).

El extracto metanólico de la temporada de lluvias ejerció un efecto bactericida sobre *S. aureus* 23 MR, con concentraciones de 6 y 9 mg/mL a las 24 h de haber aplicado las concentraciones mencionadas. Por el contrario, el extracto metanólico de la temporada seca produjo un efecto bacteriostático. En general, los antimicrobianos bactericidas inhiben la síntesis de la pared, alteran la membrana citoplasmática o interfieren en algunos aspectos del metabolismo del ADN y los bacteriostáticos inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Es importante destacar que *S. aureus* ha generado una

resistencia a los antibióticos (Mensa *et al.* 2013). Referente a la cinética de crecimiento bacteriano de *K. pneumoniae*, el extracto metanólico obtenido de la colecta de la temporada seca fue el más efectivo al tener un efecto bactericida, puesto que inhibió el 99.9% del crecimiento bacteriano. Velázquez *et al.* (2013) reportó un caso de infección nosocomial por *K. pneumoniae* resistente a un antibiótico de espectro extendido, esto es de suma gravedad pues limita aún más los tratamientos alópatas, por ello es de suma importancia generar líneas de estudios de nuevos antimicrobianos.

Respecto al efecto antifúngico, los tres extractos de *B. mexicana* colectada en la temporada de lluvias inhibieron el crecimiento radial de *A. niger* y el extracto acetónico y metanólico inhibieron a *T. mentagrophytes*, ambas especies de hongos son consideradas oportunistas. *T. mentagrophytes* causa micosis superficiales que afectan piel, pelo y uñas; por su parte, *A. niger* provoca aspergilosis pulmonar y aspergiloma que se desarrolla en una zona de enfermedad pulmonar o cicatrización pulmonar previa. Las CF_{50} menores fueron las mostradas por el extracto metanólico correspondiente a la temporada de lluvias, con 0.65 mg/mL contra *A. niger*, mientras que para *T. mentagrophytes* el extracto acetónico mostro una CF_{50} de 6.5 mg/mL. En cambio, los extractos de la temporada seca inhibieron el crecimiento de *F. sporotrichum*, que causa infecciones localizadas en lesiones producidas por traumatismos y tiene la capacidad de adherirse al material de plástico como los catéteres y lentes de contacto, el extracto acetónico inhibió el crecimiento de *F. moniliforme*, mientras que el crecimiento de *T. metagrophyes* disminuyó con los extractos hexánico y metanólico. *A. niger* fue inhibido por el extracto metanólico con una CF_{50} de 1.1 mg/mL, entre tanto, el extracto acetónico mostro una CF_{50} de 4.7 mg/mL sobre el hongo mencionado.

Las concentraciones fungicidas de los extractos obtenidas en el presente trabajo sobre los hongos mencionados son mayores que las reportadas por Serrano (2013) y que las reportadas para el ketoconazol (utilizado como control positivo). Serrano (2013) menciona que la actividad antifúngica de la partición metanólica de *B. morelensis* mostró una CF_{50} de 0.78 mg/mL sobre *T. mentagrophytes*. Por otra

parte, Montes de Oca-Márquez *et al.* (2017) reportó una CF_{50} de 0.02 mg/mL sobre la cepa mencionada. De acuerdo con estos resultados es importante mencionar que el ketoconazol es un antimicótico de amplio espectro constituido por un solo compuesto activo, en cambio los extractos son mezclas de compuestos, por lo que los resultados obtenidos para los extractos de *B. mexicana* pueden considerarse aceptables.

Los efectos del aumento de lluvias causan en las plantas enfermedades severas por hongos y mohos (Garrett *et al.*, 2013), se ha reportado que la actividad antifúngica puede deberse a algunos grupos de metabolitos secundarios identificados, como las saponinas y los flavonoides, ya que el efecto antimicrobiano de estos grupos de MS ha sido documentado, tal es el caso del estudio realizado por Sindambiwe *et al.* (1998) quienes reportaron la actividad antifúngica con mezclas de saponinas las cuales inhibieron el crecimiento de una especie del género *Trichopyton*. De igual manera, Li *et al.* (1999) reportaron la actividad antifúngica de tres saponinas contra una especie del género *Aspergillus*. El mecanismo de acción antifúngica de los fenoles puede estar relacionado con la inhibición de la germinación de los conidios en los hongos miceliados, otro posible mecanismo puede ser la inactivación de la síntesis de aminoácidos esenciales (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015).

Por lo mencionado, es evidente que el extracto metanólico de la corteza de *B. mexicana* colectada en temporada seca mostró mayor actividad antimicrobiana, es preciso destacar que también presentó la mayoría de los metabolitos secundarios, excepto alcaloides. Las diferencias en el efecto biológico y en composición química de los extractos se deben a varios factores entre los que se pueden incluir las condiciones ambientales, la falta de nutrimentos, radiación solar, la depredación, enfermedades y el déficit de agua, que pueden restringir el crecimiento de las plantas y reducir la velocidad fotosintética. En tales condiciones, los carbohidratos no estructurales tienden a acumularse y pueden explicar el incremento en la síntesis de sustancias de defensa, basadas en carbonos perteneciente al metabolismo secundario. La confirmación de este balance en carbono–nutrimentos ha sido

encontrada en especies que se desarrollan en medios de baja disponibilidad de nutrimentos, o de agua, en las que se produce un aumento de taninos, lignina, fenoles y/o glucósidos (Bryant y Julkunen-Tiitto, 1995). De igual modo, Kumar (1997) reportó que los distintos compuestos que puede producir una especie presentan una determinada distribución dentro los órganos, los tejidos y las células de una planta, y ello responde a menudo a las influencias ambientales; en el caso de los MS presentes en la madera son cruciales para su durabilidad, debido a que retardan la descomposición y la protegen contra los organismos de descomposición y la concentración puede variar de una temporada a otra (Taylor *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2010).

8. Conclusión

El presente trabajo comprueba que *B. mexicana* posee actividad antimicrobiana, tal efecto varía de acuerdo con la temporada de colecta, lo cual se debe a la respuesta de la especie ante las diferentes condiciones y factores de estrés biótico y abiótico a los que se encuentra sometida. Además, se encontraron diferencias en la composición química de los extractos obtenidos de la corteza colectada en las dos temporadas, siendo la corteza de la temporada seca la que presenta mayor diversidad de grupos de metabolitos secundarios. Los resultados permiten avalar el uso de *B. mexicana* en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso y permiten confirmar que la acumulación de metabolitos secundarios en las plantas ocurre de manera diferencial.

9. Apéndices

9.1 Apéndice I

a) Descripción botánica de *B. mexicana*

Árbol o arbusto dioico de hasta 8-10 m de altura, tronco hasta a 1 m de diámetro. Las ramas de 1 a 2 años de edad se encuentran cubiertas con una corteza coriácea de color marrón rojizo oscuro, lisa con protuberancias puntiagudas aplanadas lateralmente formadas a partir de las bases de pecíolo, de 7 mm de largo, la corteza más vieja se torna gris. Las hojas tienen superficie superior de raquis y costillas medias de folíolos rojizos, folíolo terminal ovado a ampliamente ovado, folíolos laterales opuestos o sub-opuestos, sésiles, base desigualmente truncada, ápice aguda, nervios 10-12 pares, cada nervio termina en un diente marginal, el margen es dentado grueso, la superficie superior es pubérula, la superficie inferior es poco pubescente, es delgadamente papirácea; pecíolo (arriba de la base) largo con la base extendida dorsiventralmente, oblicua y ampliamente subtriangular en la vista lateral con el lado inferior (dorsal) más largo y convexo (Forman, 1989).

Las Inflorescencias: macho 6-10 cm y hembra 9-11 cm. Las flores masculinas se presentan en pedicelos de 0 a 8 mm de largo: cáliz verde, 2 mm de largo, los lóbulos estrechamente triangulares, agudos, 1 a 5 mm de largo, externamente puberulosos; pétalos blancos, agudos, 3 a 7 mm de largo, estambres glabros, ligeramente

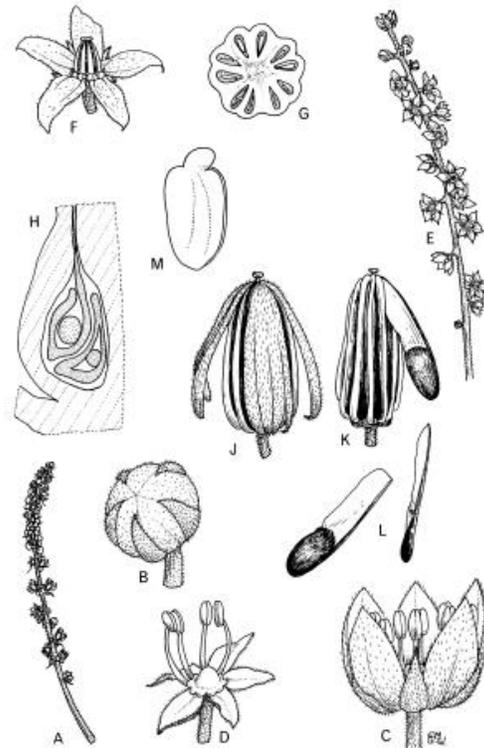


Figura 7. *Beiselia mexicana* A inflorescencia masculina, B brote masculino, C flor masculina, D flor masculina con pétalos y la mayoría de los estambres removidos para mostrar discos y pistilo, E inflorescencia femenina, F flor femenina, G corte transversal de ovario, H corte longitudinal de ovario, J fruto con las divisiones del pericarpio, K columnela central del fruto con un píreno, L pírenos en vista lateral y abaxial, M embrión (Tomado de Forman *et al.*, 1989).

desiguales. Las flores femeninas se encuentran en pedicelos de 2 mm de largo: sépalos y pétalos como las masculinas; ovario de 2 mm de largo. El fruto es cilíndrico-ovoide; pericarpio muy delgado que se divide generalmente desde la base en tiras recurvadas de 1 mm de ancho, las paredes son firmemente esponjosas en la textura pireno aplanado (figura 7) (Forman, 1989).

b) Información taxonómica

Reino Plantae

Phylum Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Sapindales

Familia Burseraceae

Tribu Bursereae

Subtribu Boswelliinae

Género *Beiselia*

Especie *B. mexicana* Forman

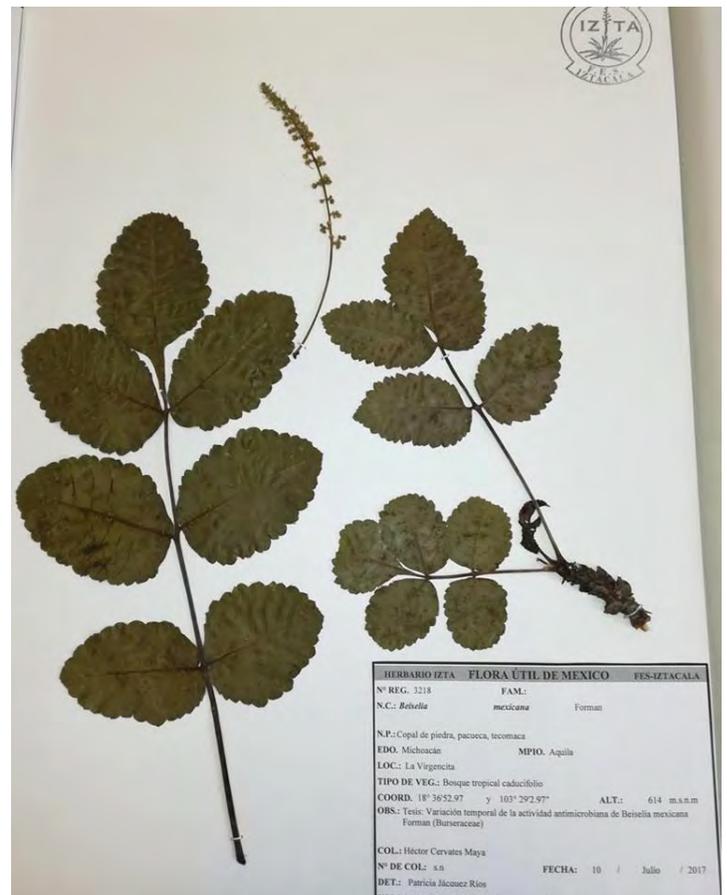


Figura 8. Ejemplar de herbario de *B. mexicana*

9.2 Apéndice II

Método de maceración (Domínguez, 1973).

El método de maceración consiste en la obtención del extracto con solventes orgánicos a partir de material vegetal. Para ello se coloca el material vegetal seco y pulverizado en un matraz, se agrega el solvente apropiado de acuerdo con el extracto que se desea obtener (hexano, acetona y metanol).

Se deja reposar durante 24 horas, se filtra el extracto y se evapora el exceso de solvente a presión reducida. La extracción se realiza las veces necesarias para obtener el máximo rendimiento. Finalmente, se permite que el solvente se evapore totalmente, el extracto se pesa y con ello se determina el rendimiento del extracto expresándolo en gramos.

9.3 Apéndice III

Pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios.

Tubo N°	Grupo de MS	Reactivos	Agregar en el tubo correspondiente	Adicionar		Prueba positiva
1	Fenoles	FeCl ₃	1 mL solución patrón	3 gotas de FeCl ₃ (1%)	Mezclar	Coloración azul o verde
1	Taninos	Reactivo de gelatina	Tubo con la solución de la prueba positiva de fenoles	3 gotas de reactivo de gelatina (1%)	Mezclar	Precipitado azul o verde oscuros
2	Alcaloides	Dragendorf	1 mL de solución patrón	3 gotas de reactivo dragendorf	Mezclar	Precipitado color rojizo
3	Alcaloides	Mayer	2 mL de solución patrón	3 gotas de reactivo mayer	Mezclar	Precipitado lechoso
4	Glucósidos	α-naftol y HCl	3 mL de solución patrón	3 gotas de α-naftol, 3 gotas de HCl concentrado	El HCl debe dejarse caer por las paredes internas del tubo	Anillo morado
5	Saponinas	Agua destilada	10 mg de extracto	2 mL de agua destilada	Agitar por al menos dos minutos	Espuma que permanece por al menos un minuto
6	Cumarinas	NaOH y HCl	1 mL de NaOH al 10%	5 gotas de solución patrón (extracto)	Mezclar	Si hay coloración amarilla, agregar 3 gotas de HCl al 10%. Si la mezcla se vuelve transparente la prueba es positiva
7	Triterpenos y esteroides	Lieberman-Buchard	2 mg de extracto disuelto en 1 mL de cloroformo	3 gotas del reactivo de Lieberman-Buchard	Mezclar	Color azul o verde: positivo para esteroides color rojo, violeta o morado: positivo para triterpenos
8	Monoterpenos	Vainillina-H ₂ SO ₄	Placa de silica gel (2 cm ²) 1 gota de solución patrón en el centro de la placa	1 gota de Vainillina (5%) 1 gota de H ₂ SO ₄ (5%)	Dejar secar, calentar en una parrilla a temperatura baja	Halo azul verdoso, morado o naranja rojizo

9.4 Apéndice IV

Método de difusión en agar Kirby-Baüer (Koneman et al., 2006).

El método de difusión en agar se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de sustancias o extractos, los cuales inhiben el crecimiento de los microorganismos al difundirse en el medio que contiene el cultivo de bacterias o levaduras. La inhibición del crecimiento de la población de microorganismos se observa mediante un halo claro donde no hay microorganismos y representa el espacio en que difundió el extracto o sustancia con actividad antimicrobiana.

Para evaluar la actividad antibacteriana se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon), para la actividad antifúngica (sobre levaduras) se utiliza como medio de cultivo el agar papa dextrosa (PDA); ambos promueven el crecimiento de las poblaciones microbianas a evaluar. Las placas se preparan con un espesor uniforme de 4 mm de medio de cultivo, lo cual es importante ya que si es más delgado las sustancias a evaluar tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; por el contrario, un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo de cada especie bacteriana se prepara tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de microorganismos, se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müeller-Hinton, se enjuaga bien en el líquido, para descargar todo el material, y luego se retira el asa de siembra. Los tubos con los inóculos bacterianos se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio es equivalente al estándar N° 0.05 de McFarland, que equivale a una concentración de aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL.

El cultivo de las bacterias en el medio, se efectúa sumergiendo un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana, se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocular la superficie de una placa de agar de Müeller-Hinton a temperatura ambiente.

Finalmente, se siembra mediante estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente de 60° después de cada estría. Se permite que el inóculo se absorba en la superficie de la placa y se procede a aplicar las sustancias, para lo cual se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro, hechos de papel Whatman N° 5. Previamente, cada sensidisco se impregna con 2 mg de las sustancias a evaluar.

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias se colocan en la superficie del agar manualmente, con la ayuda de una pinza estéril. Como control positivo para los bioensayos, se evalúa la susceptibilidad de las cepas bacterianas con sensidiscos impregnados con 45 µg de cloranfenicol; como control negativo se utilizan sensidiscos impregnados con 10 µL de los solventes utilizados para la extracción, dejándolos evaporar durante 24 horas, al igual que los extractos experimentales.

Las placas se colocan a 37 °C, sin mayor tensión de CO₂ debido a que en presencia de CO₂, se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso de pH y el desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente las zonas de inhibición. Así mismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en la velocidad de difusión y alteración de la zona de inhibición. Para la interpretación de resultados, la zona de inhibición se mide con una regla calibrada en mm. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportaron los valores en mm.

9.5 Apéndice V

Método modificado de dilución en agar (Koneman *et al.*, 1985)

En esta técnica la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una en una placa de microtubos plástica. Se utilizaron placas con 96 concavidades.

La microplaca se prepara colocando 50 microlitros de caldo de Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración de extracto que se quiere probar en las concavidades apropiadas. La placa se deja durante 24 horas con el fin de que se evapore el solvente en el cual se disolvió el extracto. Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) y se incuba a 35°C durante 24 horas obteniendo una concentración bacteriana de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL. De esta suspensión microbiana, se toman 10 μ L y se suspenden en 10 mL de solución salina (0.9%) para obtener un inóculo microbiano de 1.5×10^5 UFC/mL. En cada una de las 96 concavidades se colocan 50 microlitros de esta suspensión.

Una vez que se encuentra cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con su tapa para evitar el desecamiento durante la incubación la cual se coloca a 35°C durante 24 horas. Como control negativo se utiliza el solvente del extracto y clorenfenicol como control positivo. Después del tiempo de incubación se añade a cada cavidad 50 microlitros de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada. La placa se incuba otros 30 minutos. En las cavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazán, de color rojo visible, observándose un botón rojo en el fondo de la cavidad. Donde no hay desarrollo la solución permanece clara.

9.6 Apéndice VI

Cinética de crecimiento en la población bacteriana (Método modificado por Ávila, 1996)

La cinética de crecimiento bacteriano consiste en determinar el comportamiento del crecimiento de los microorganismos a través del tiempo, al ser sometidos a al CBM del extracto, lo que permite determinar el tiempo en que son eliminados por las sustancias o extractos.

El inóculo bacteriano se prepara de acuerdo con el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL. Los extractos se incluyen en tubos con caldo Muller-Hinton a una concentración igual a la CBM y sus múltiplos medios, esto es la CMI y la mitad de la CMI. Posteriormente, con una micropipeta se inoculará 0.1 mL de la suspensión bacteriana en los tubos con las diferentes concentraciones del extracto para obtener una concentración bacteriana en cada tubo de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL de caldo. Los tubos se incuban sin presión de CO_2 a 37 °C.

De cada tubo se toman muestras cada dos horas, durante los primeros cuatro tiempos (T_0-0 , T_1-2 , T_2-4 , T_3-6 , T_4-8 , T_5-12 , T_6-24) (tiempos-horas transcurridas); en el tiempo cinco las muestras se toman cada cuatro horas (T_5-12). Para el tiempo seis la muestra se tomó después de doce horas más dando un total de 24 horas después del inicio del experimento (T_6-24).

Para determinar las UFC en cada tiempo se efectúan dos diluciones de cada concentración en solución salina estéril y se siembra en placas con agar para permitir su crecimiento, las cuales se incuban durante 24 a 37 °C. Finalmente, se cuenta el número de UFC y se grafica el Log_{10} del número de UFC contra el tiempo.

9.7 Apéndice VII

Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).

El método de inhibición del crecimiento radial se utiliza para determinar el efecto inhibitorio de las sustancias o extractos sobre el crecimiento de hongos miceliados.

El bioensayo se lleva a cabo en cajas Petri (90 x 15 mm) con 20 mL de agar PDA. En el centro de la placa se coloca el inóculo fúngico que consiste en un botón de micelio de 5 mm de diámetro. Posteriormente, se colocan discos impregnados con los extractos (hexánico, acetónico, y metanólico) con una concentración de 2 mg/disco. Los discos se colocan a una distancia de 3 cm del inóculo fúngico. Las placas se incubaron a 28 °C durante un lapso de 72 a 96 horas, hasta que el micelio cubre la superficie del agar. Al ser una prueba cualitativa, los resultados se reportaron como positivo o negativo, de acuerdo con la actividad de las sustancias evaluadas.

9.8 Apéndice VIII

Método de dilución en agar en hongos miceliados (Wang y Bun ,2002).

El método de dilución en agar sobre hongos se utiliza para determinar la concentración de sustancias o extractos, capaz de inhibir el crecimiento del micelio. Para estos bioensayos se preparan placas con diferentes concentraciones de los extractos (3.0, 2.0, 1.0, 0.50 y 0.25 mg/mL) para ello se preparan una solución patrón y, con base en ésta se toman alícuotas, las cuales se agregan a 3 mL de agar papa dextrosa, a una temperatura de 45 °C, con la finalidad de obtener las concentraciones señaladas. Una vez agregada cada concentración del extracto, la mezcla se agita rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocan en placas de 24 pozos, agregando 1 mL de agar con cada una de las concentraciones en cada pozo. De cada concentración se agregará tres repeticiones (tres pozos por concentración).

Después de que el agar solidifica se coloca el inóculo fúngico, que consiste en un botón de micelio de 1 mm de diámetro, en el centro de cada pozo con las concentraciones a evaluar. Como control positivo se utilizan pozos sin extracto, a las cuales se les considera como el 100% de crecimiento radial y como controles negativos se usan los diferentes solventes, de acuerdo con el volumen de las alícuotas utilizadas. Las placas se incuban a 28 °C durante 24 a 72 horas, de acuerdo con el crecimiento de los microorganismos utilizados. Finalmente, se mide el área de crecimiento micelial en mm, que se reporta en porcentaje de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{C - T}{C} \right] \times 100$$

Donde: C = Extensión hifal de (mm) de control

T = Extensión hifal (mm) de las placas tratadas con los extractos

Con lo anterior se determina la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM), tomando como CI_{50} la concentración que mostró una disminución del 50% del crecimiento micelial y como CFM aquella en la que no hubo crecimiento micelial; es decir, inhibió el crecimiento al 100%.

10. Referencias

- Acosta, L. 2003. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cuba de plantas Medicinales*, 19(1): 1-6.
- Afsar, v., Reddy, Y. y Saritha, K. 2012. *In vitro* antioxidant activity and anti inflammatory activity of methanolic leaf extract of *Boswellia Serrata*. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1(4): 15-23.
- Akerele, O. 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro mundial de la Salud*, 14: 390-395.
- Akula, R. y Ravishankar, G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11):1720-1731.
- Almaraz, N., Ávila-Reyes, J., Delgado-Alvarado, E., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J. 2006. El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto, 1(2): 39-50.
- Alós, J. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10): 692- 699.
- Álvarez-Loayza, P. y Terborgh, J. 2013. Patología de plantas en bosques tropicales. En: Groenendijk, Tovar & Wust (Eds). *Reporte Manu 2013: Pasión por la Investigación en la Amazonía Peruana*. San Diego Zoo Global Perú y SERNANP: 98-107.
- Anaya, A. y Espinosa-García, F. 2006. La química que entreteje a los seres vivos. *Revista Ciencias*, 83: 4-13.
- Ang, J., Ezike, E. y Asmar, B. 2004. Antibacterial resistance. *The Indian Journal of Pediatrics* , 71: 229-239.
- Argueta, A.1987. Medicina y cultura popular en México En: *El Futuro de la Medicina Tradicional en la atención a la salud de los Países Latinoamericanos*. México: CIESS. 153-162.
- Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca. Serie Fisiología vegetal*, 2(3): 119-145.
- Ávila, J.G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional de purépecha. Tesis de maestría. Fes Cuautitlán. UNAM. México.

- Bhalla, R., Narasimhan, K. y Swarup, S. 2005 Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Reports*, 24: 562-571.
- Bork, P., Schmitz, M., Weimann, C., Kist, M. y Heinrich, M. 1996. Nahua Indian Medicinal Plants (Mexico). Inhibitory activity on NF-B as an anti-inflammatory model and anti-bacterial effects. *Phytomedicine*, 3: 263-269.
- Bryant, J. y Julkunen-Tiitto, R. 1995. Ontogenetic development of chemical defense by seedling resin birch: Energy cost of defense production. *Journal of Chemical Ecology*, 21: 883-896.
- Bryant, J., Reichardt, P. y Clausen, T. 1992. Chemically mediated interactions between Woody plants and browsing mammals. *Journal of range management*, 45(1): 18-24.
- Bryant, J., Chapin, F. y Klein, D. 1983. Carbon/Nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, 40:357-368.
- Cabrera, C., Gómez, R. y Zuñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2): 149-158.
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, M. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1): 44-52.
- Camporese, A., Balick, M., Arvigo, R., Esposito, R., Morsellino, N., De Simone, F. y Tubaro, A. 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants of Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 103-107.
- Carretero, M., López-Pérez, J., Abad, M., Bermejeo, P., Tillet, S., Israel, A. y Noguera-P, B. 2008. Preliminary study of the antinflamatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 11-15.
- Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M., Giono, S., Hernández-Rodríguez, C., Rodríguez, M., Soler, L., Ozores, A. y Figueras, M. 2002. El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 22(4): 206-216.
- Chapin, F. 1980. The Mineral Nutrition of Wild Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11:233-260.

- Chapin, F. 1991. Integrated responses of plants to stress. *Bioscience*, 41(1): 29-36.
- Cházaro, B. M., Mostul, B. L y García, L. F. 2011. Los copales mexicanos (*Bursera* spp.). *Bouteloua*, 7: 57-70. Disponible en <http://goo.gl/xxCLSx> (Consulta: 16-09-2018)
- COFEMER. Comisión Federal de Mejora Regulatoria 2015. Solicitud de inclusión a la NOM-059-SEMARNAT de la especie *Beiselia mexicana* Forman. Disponible en <http://goo.gl/z2sE46> (Consulta: julio de 2018).
- CONABIO. 2009. Síntesis Capital Natural de México conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Disponible en <http://n9.cl/SGs> (Consulta: agosto de 2017).
- CONABIO. 2013. Naturalista. México. *Beiselia mexicana*. Disponible en <http://goo.gl/5kGdiu> (Consulta: julio de 2018).
- CONABIO. 2018. Naturalista. México. *Beiselia mexicana*. Disponible en <http://goo.gl/qpChFF> (Consulta: junio de 2018).
- Coneval. Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. 2016. Medición de la pobreza. Disponible en <http://goo.gl/EoMLmV> (Consulta: julio de 2018).
- Correa, C. 2002. Protección y promoción de la medicina tradicional consecuencias para la salud pública en los países en desarrollo. Buenos Aires. Ed. Universidad de Buenos Aires. pp. 10-12.
- Cosme. I. 2008. El uso de las plantas medicinales. *Revista intercultural*. 23-26.
- Cuivenor, C. 1973. Alkaloids. *Chemistry and biochemistry of herbage*. New York: Academic Press. pp. 375-379.
- Domínguez, X. 1973. *Métodos de investigación Fitoquímica*. México: Ed. Limusa.
- Domínguez, X. 1979. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Ed. Limusa: 45-47 y 281.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., and Bacher, A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6:78-84.
- Espinosa-García, F. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. En: Anaya, A., Espinosa-García, F. y Cruz-Ortega, R. (Eds).

Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. México. Universidad Nacional Autónoma de México y Plaza y Valdés: 231-250.

- Facchini, P.J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:29-66.
- Forman, L., Brandham, P., Harley, M. y Lawrence, T. 1989. *Beiselia mexicana* (Burseraceae) and its affinities. *Kew Bulletin*, 44:1-31.
- Ganjewala D., Sam, S. y Khan. K. H. 2009. Biochemical compositions and antibacterial activities of *Lantana camara* plants with yellow, lavender, red and white flowers. *EurAsian Journal of BioSciences*, 3: 69-77.
- García-Barriga, H. 1992. Flora medicinal colombiana. Tomo II. Colombia: Ed. Tercer Mundo editores: 538.
- García-Rodríguez, Y., Bravo-Monzón, A., Martínez-Díaz, Y., Torres-Gurrola, G. y Espinosa-García, J. 2012. Variación Fitoquímica Defensiva en Ecosistemas Terrestres. En Rojas, J. y Malo, E. (Eds). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. México. El colegio de la Frontera Sur: 218-220.
- Garret, K., Forbes, G., Gómez, L., González, M., Skelsey, P. y Sparks, A. 2013. Cambio climático, enfermedades de las plantas e insectos plaga. En: Jiménez, E. *Cambio climático y adaptación en el Altiplano Boliviano*. Bolivia. CIDES-UMSA: 71-89.
- Gershenzon, J. 1984. Changes in levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *Recent Advances in Phytochemistry*, 18: 273-320.
- Giedraitien A, Vitkauskien A, Naginien R. y Pavilionis A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina Kaunas*, 47(3): 137-146.
- Gómez-Pampa, A. 2015. Las raíces de la botánica mexicana. *Acta Biológica Panamensis*, 1: 87-111.
- González, A. y Castro, M. 2017. Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *Lacandonia*, 2(1): 123-130.

- Greenberg, M., Doods, M. y Tian, M. 2008. Naturally occurring phenolic antibacterial compounds show effectiveness against oral bacteria by a quantitative structure activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23): 11151-11156.
- Hart, C. 1998. La resistencia a los antibióticos ¿Un problema creciente? *British Medical Journal*, Ed. Latinoam., 6: 147-148.
- Hernández, C., Aguilera, M. y Castro, G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4): 137-151.
- Hernández, T., García-Bores, A. M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H. y Lira, R. 2015. Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 18(2): 116-121.
- Hoggsteger, C. 1994. Uso de plantas medicinales. México: Ed. Árbol editorial: 9-12.
- Hosler, D. y Mikita, M. 1987. Ethnobotany: The chemist's source for the identification of useful natural products. *Journal of Chemical Education*, 64(4): 328-331.
- Jazet, P., Tchoumboungang, F., Ndongson, B. Agwanande, W., Sandjon, B., Amvam P. y Menut, C. 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4): 606-611.
- Koneman, E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. y Winn W.C. 2006. *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires. Argentina: Ed. Médica Panamericana. pp. 1420-1421.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell. V.R. y Sommer, H.M. 1985. *Diagnóstico microbiológico*. México: Ed. Médica Panamericana. pp. 386-393.
- Koudou, J., Obame, L., Kumulungui, B., Edou, P., Figueredo, G., Chalchat, J. y Traore, A. 2009. Volatile constituents and antioxidant activity of *Aucoumea klaineana* Pierre essential oil. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 3(6): 323-326.

- Kumar, R. 1997. Anti- nutritional factors. The potential risks of toxicity and the methods to alleviate them. Legumes trees and other fodder trees as protein source for livestock. Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO). Disponible en <http://goo.gl/bX1zfi> (Consulta: septiembre, 2018).
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. New York, USA: Academic Press. pp. 607.
- Li, X., Elsohly, H., Nimord, A. y Clak, A. 1999. Antifungal jujubogenin saponins from *Colubrina retusa*. Journal of Natural Products, 62(5): 674-700.
- Mabbeeley, D. 1987. The Plant-Book. Inglaterra: Cambridge University Press.
- Madriz, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas, 63: 22-32.
- Martínez, P. 2016. Respuesta germinativa *ex situ* de *Beiselia mexicana* (Copal de piedra). Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Martínez-Martínez, L. y Calvo, J. 2010. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 28(4): 4-9.
- Mensa, J., Sorlano, A., Linares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M., Alvarez-Rocha, L., Maseda, E., Moreno, A., Pasquau, J., Gómez, J., Parra, J., Candel, J., Azanza, J., García, J., Marco, F., Soy, D., Grau, S., Arias, J., Fortún, J., Arastides de Alarcón, C. y Picazo, J. 2013. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Revista española de quimioterapia, 26: 1-84.
- Montes de Oca-Márquez C., Hernández-Delgado C.T., Orozco-Martínez J., García-Bores A.M., Ávila-Acevedo J.G., Ortiz-Melo M.T., Peñalosa-Castro I., López-Moreno G.†, Serrano-Parrales R. 2017. Actividad antibacteriana y antifúngica de *Dalea Carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. Revista Fitotecnia Mexicana. 40(2): 161-168.
- Mooney, H.A. 1972. The carbon balance of plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 3:315-346.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. y Tawara, S. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*. Phitochemistry, 8(26): 2231-2234.

- Mothan, R. y Lindequist, U. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 177-181.
- Moustapha, B., Gutiérrez-Avella, D., Mendoza, S., Rodríguez-López, V. y Castañeda-Moreno, R. 2014. Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6): 527-536.
- Nascimento, M., Santana, A., Maranhao, C., Oliveira, L. y Bieber, L. 2013. Phenolic extractives and natural resistance of wood. *Biodegradation Life of Science*, 349-370.
- Nolasco, E. 2014. Analisis de variación temporal de los principales metabolitos secundarios presentes en *Bursera morelensis* (Ramírez). Tesis de Licenciatura en Biología, Fes Iztacala. UNAM.
- Nychas, G. 1995. Natural Antimicrobials from plants. *New Methods of food preservation*. G.W. Gould. Ed. Blakie Academia y Professional. Glasgow: 1-21.
- Ocegueda, S., Moreno, E. y Koleff, P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*, 62: 12-15.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2004. Nuevas Directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Disponible en <http://goo.gl/8jijQD> (Consulta: julio de 2018).
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. Disponible en <http://goo.gl/Ftd3tU> (Consulta: junio de 2018).
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2016. Enfermedades infecciosas desatendidas en las Américas: Historias de éxito e innovación para llegar a los más necesitados. Disponible en <http://goo.gl/3k5aSp> (Consulta: julio de 2018).
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2017. Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Disponible en <http://goo.gl/7yiAeS> (Consulta: julio de 2018).
- Oromí, J. 2000. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36(10): 367-3670.
- Osuna, L., Tapia, M. y Aguilar, A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánica, fitoquímico y farmacológico. Barcelona. España: Ed. Universitat de Barcelona: 9-11.

- Pérez-Cano, H. y Robles-Contreras, A. 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica*, 4(3): 186-191.
- Pezzuto, J. 1995. Natural product cancer chemoprotective agents. Recent advances in phytochemistry. *Phytochemistry of medicinal plants*, New York: Plenum Press.
- Raja, A., Ali, F., Khan, I., Shawl, A., Arora, D., Shah, B. y Taneja S. 2011. Anti-staphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto-b-boswellic acid from *Boswellia serrata*. *BMC Microbiology*, 11 (54): 1-9.
- Reigosa, M., Sánchez-Moreiras, A. y González, L. 1999. Ecophysiological Approach in Allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(5): 577-608.
- Rendón, B., Rebollar, S., Caballero, J. y Martínez, M. 2001. Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XX. México. UAM. pp. 23-27.
- Ringuélet, J. y Viña, S. 2013. Productos naturales vegetales. Argentina: Editorial de la Universidad de Plata.
- Robles, J., Torrenegra, R., Gray, A. I., Piñeros, C., Ortiz, L., y Sierra, M. 2005. Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4): 283-286.
- Rodríguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R. y Aviles-Marin, M. 2015. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista argentina de microbiología*, 47(1), 72-77.
- Rojas, N. y Rodríguez, M. 2008. Actividad antimicrobiana de *Tectona grandis* L. f., *Bursera simaruba* (L.) Sarg. y *Cedrela odorata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4): 1-7.
- Rzedowski, J., Medina, R. y Calderón, G. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana*, 70: 85- 11.

- Salinas, D. O., Arteaga, G. L., León, I., Dorado, O., Valladares, M. y Navarro, V. M. 2009. Actividad antimicrobiana de las plantas medicinales de la reserva de la biosfera Sierra de Huautla en Morelos (México). *Polibotánica*, 28: 213-225.
- Santana, A., Maranhão, C., Santos, J., Cunha, F., Conceição, G., Bieber, L. y Nascimento, M. 2010. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64: 7-12.
- Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Inuma, M. y Tosa, H. 1996. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 54: 171- 176.
- Ssa (Secretaria de Salud). 2013. Programa de acción específico: Prevención y control de las enfermedades respiratorias e influenza. Disponible en <http://goo.gl/SVklQc> (Consulta: julio de 2018).
- Selmar, D. y Kleinwächter, M. 2013. Stress Enhances the Synthesis of Secondary Plant Products: The Impact of Stress-Related Over-Reduction on the Accumulation of Natural Products. *Plant and Cell Physiology*, 54(6), 817–826.
- Sepulveda-Jimenez, G. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3): 355-363.
- Serrano, R. 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae) de San Juan Rafael, Coxcatlan, Puebla. Tesis de Doctorado. FES Iztacala. UNAM. México.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B. 2010. An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of plant Sciences*, 5(3): 22-247.
- Sindambiwe, J., Calomme, M., Geerts, S., Pieters, L., Vlietinck, A. y Vanden, D. 1998. Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *Journal of Natural products*, 61(5), 585-590.
- Soto, R., Vega, A. y Tamajón, L. 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf (caña santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7:89-95.

- Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L. y Pahua, D. 2016. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. Revista de la Facultad
- Suleiman, M. 2014. Prenylated flavonoids from the stem Wood of *Commiphora opobalsamum* (L) Engl. (Burseraceae). Journal of King Saud University Science, 27: 71-75.
- Taylor, A., Gartner, B. y Morrell, J. 2006. Effects of Heartwood Extractive fractions of *Thuja plicata* and *Chamaecyparis nootkatensis* wood degradation by termites or Fungi. Journal of Wood Science, 52:147-153.
- Tello, A., Austin, B., Telfer, T. 2011. Selective Pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health environ. Environ Health Perspect. 120(8): 1100-106.
- Trethewey, R. y Krotzky, A. 2007. Metabolic Profiling: Applications in Plant Science. En The Handbook of Metabonomics and Metabolomics. Lindon, J., Nicholson, J. y Holmes, E. (Eds). Elsevier: 443-487.
- Thulin, M., Beier, B., Razafimandimbison, G. y Banks, H. 2008. *Ambilobea*, a new genus from Madagascar, the position of *Aucoumea*, and comments on the tribal classification of the frankincense and myrrh family (Burseraceae). Nordic Journal of Botany, 26: 218-229.
- Valle, C. 2012. Los valores interiores menos conocidos de las plantas: Poliaminas y Metabolitos Secundarios. Encuentros en la Biología, 5(138): 33-34.
- Velázquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo, Y., Sascquispe, R., Suárez, L. y Fernández, N. 2013. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KCP en Perú. Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna, 26(4): 192-196.
- Vivanco, J., Cosio, E., Loyola-Vargas, V. y Flores, H. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. Investigación y Ciencia, 68-75.
- Wang, H. y Bun, T.N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry, 61: 1-6.

- Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K. y Schempp, C. 2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, 14: 508-516.
- Weeks, A., Daly, D. y Simpson, B. 2005. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 85-101.
- Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. en: M. Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374.
- Ya C, Gaffney, S., Lilley T., Haslam E. 1988. Carbohydrate-polyphenol complexation. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: Plenum Press.
- Zucker, W. 1983. Tannins: Does structure determine function. An ecological perspective. *The American Naturalist*, 121: 335-365.