



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Plumbago pulchella* Boiss
(Plumbaginaceae)**

T E S I S

Para obtener el título de:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

BONILLA MARTÍNEZ IVONNE BERENICE

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rocío Serrano Parrales



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizo en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. Serrano Parrales Rocio

Jurado:

Dr. Jose Guillermo Ávila Acevedo

Dra. Adriana Montserrat Espinosa Gonzales

Mtra. Julieta Orozco Martínez

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado

Dra. Rocio Serrano Parrales

AGRADECIMIENTOS

A la universidad por darme los mejores años académicos desde la preparatoria, los mejores conocimientos y oportunidades que he tenido, también por todas las experiencias y enseñanzas que han hecho que me enamorar mas de esta profesión y crecer personalmente. Gracias por que en ella conocí a los mejores amigos, el amor y a excelentes profesores en la mejor facultad, quienes me motivaron y enamoraron de la biología.

A mi tutora, la doctora Rocio Serrano Parrales, por compartir sus conocimientos y ayudarme desde el primer día, además de hacer el ambiente de laboratorio muy agradable y divertido. Por su tiempo y paciencia a lo largo de mi trabajo de titulación y por brindarme su apoyo y preocupación durante mi estancia de investigación. Gracias Dra.

A la doctora Tzasná Hernández D. por sus conocimientos brindados y sus comentarios positivos y apoyo para realizar este trabajo.

A la maestra Julieta Orozco por sus correcciones para realizar este trabajo y apoyo en todos los tramites.

A la dra. Montserrat Espinosa por todos sus enseñanzas y conocimientos que me brindaron, por sus revisiones y correcciones para acabar la tesis de la mejor forma.

Al doctor Guillermo Acevedo por todas sus enseñanzas en clase y transmitir su amor por la carrera, por sus revisiones en el proyecto, también por su apoyo y ayuda para poderme ir de estancia con el doctor Aqueveque.

Al doctor Antonio Estrella Parra por todo su apoyo y ayuda para lograr que me fuera de estancia y por su preocupación a lo largo de esta experiencia y por contactarme con la Sra. Mary.

A Gelitos, a Erick y a mis compañeros de laboratorio y a todo el equipo del laboratorio de farmacognosia y fitoquímica por todas sus enseñanzas y apoyo brindado. Por hacer un ambiente de trabajo divertido y relajado.

DEDICATORIAS

A mi, por la persona que te has convertido a lo largo de este camino, por transformarte y nunca estancarte. Por nunca conformarte y que a pesar de los malos momentos no te has detenido ni dejado por luchar y esforzarte por superarte y lograr tus metas y objetivos. Por que este logro es recompensa de tu esfuerzo.

A mis padres, este logro es por y para ustedes por que son mis motor y motivo para seguir esforzándome día con día para que se sientan orgullosos y por apoyarme en esta decisión de estudiar biología. A mi familia por ser mi equipo de soporte en todas mis decesiones y experiencias, por ser familia muégano para siempre.

A mi mama por ser mi ejemplo de mujer fregona, responsable, a no conformame y salir de cualquier situación si es que ya no me funciona. Por demostrarme lo que es sobresalir en lo bueno y esforzarme por ello, por todo tu esfuerzo desde que tengo memoria y apoyo incondicional, por siempre aconsejarme y ser mi hombro cuando lo he necesitado. Te amo mujer bella.

A mi papá por siempre creer y apoyarme en todas mis decisiones locas, por siempre tenerme paciencia. Por todos tus esfuerzos a lo largo de toda mi vida y nunca dejarme caer, por enseñarme a esforzarme y motivarme a dar lo mejor de mi cada día y que con trabajo y esfuerzo todo es posible. Por demostrarme que a pesar de caer es de valientes aceptarlo y remediarlo, pero con esfuerzo y compromiso. Por que siempre celebras mis triunfos y los presumes, Te amo papi.

A Katy por siempre apoyarme y estar detrás de todas mis locas ideas, siempre defenderme y estar en mis momentos bajos escucharme 24/7 y no dejarme caer. Por enseñarme que no importa que tan complicada se ponga la situación con responsabilidad y esfuerzo siempre se sale adelante. Por que Mario y tu no han dudado en apoyarme y siempre estuvieron cuando lo necesitaba y por esos dos pequeños que desde el día 1 me motivan para que se sientan orgullosos. Te amo flaka

A Ale por ser la persona que siempre me reconforta con un abrazo y me apoya y motiva. Por ayudarme en mis tareas de CCH y estudiar conmigo cuando era necesario, por no dudar de mi y siempre decirme que puedo con mas. Por escucharme y darme su mejor consejo 24/7. Por presumir mis triunfos como si fueran tuyos junto con Marcos y por esos niños que ya me ven como su ejemplo. Te amo Alita.

A Jessy, por desvelarse conmigo en esas noches largas estudiando o haciendo tarea y esas platicas de la vida universitaria jaja. Por compartir esta etapa de principio a fin desde primera fila y apoyarme en todo. Por asegurarse que sepa que esta orgullosa y por que, a pesar de todo, siempre esta cuando necesito hablar aun a la distancia. Te amo.

A Juan. Principalmente gracias por todas las enseñanzas que hemos tenido de los buenos y no tan buenos momentos. Por siempre motivarme a dar lo mejor de mi y apoyarme en todas mis decisiones desde el día uno, sin importar que tan grandes sean. Por ser como dices, mi fan #1. Por todas esas noches de desvelos acompañándome mientras estudiaba o esas tareas en las que me ayudabas, por acompañarme siempre que lo he necesitado, por estar siempre ya sea afuera del salón o en una llamada saliendo de un examen, simplemente por tu tiempo. Por estar en cada paso importante, no dejarme rendir y por llevarme a mis mejores destinos. Por que eres de lo mas bonito que me llevo de la UNAM y por todo lo que nos falta por vivir juntos.
KNY

A mis amigas y amigos que me acompañaron en oeste trayecto, principalmente a Mary, Paoli, Americus, Mariana, por todos la ayuda y apoyo mutuo en la carrera, por todas las risas interminables, no se como hubiera sobrevivido a tantas horas sin ustedes, por sus consejos y por siempre estar cuando era necesario, gracias por que hicieron la carrera una experiencia inigualable, super bonita y muy divertida y porque esta amistad perdurara pues nos falta vernos triunfar en grande a todas. ¡¡Gracias!!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
General	9
Particulares	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1. Colecta.....	10
2. Obtención de los extractos.....	10
3. Actividad antibacteriana	10
4. Actividad antifúngica	11
5. Detección de los principales grupos de metabolitos secundarios	12
6. Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS.....	14
1. Colecta.....	14
2. Rendimiento de los extractos.....	14
3. Actividad antibacteriana.....	15
3.1. <i>Evaluación cualitativa</i>	15
3.2. <i>Evaluación cuantitativa</i>	17
3.3. <i>Curvas de crecimiento bacteriano</i>	18
4. Actividad antifúngica	22
4.1. <i>Evaluación cualitativa sobre hongos levaduriformes</i>	22

4.2. Evaluación cuantitativa sobre hongos levaduriformes	23
4.3. Evaluación cualitativa sobre hongos miceliados	23
4.4. Evaluación cuantitativa sobre hongos miceliados	24
5. Detección de los principales grupos de metabolitos secundarios	25
DISCUSIÓN.....	26
ÁPENDICES.....	35
Apéndice 1.	35
Apéndice 2.	37
COLECTA	37
Apéndice 3.	38
Apéndice 4.	38
Apéndice 5.	40
Apéndice 6.	41
Apéndice 7.	42
Apéndice 8.	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Antecedentes de la actividad biológica de especies del género <i>Plumbago</i>	7
Cuadro 2. Datos etnobotánicos de <i>P. pulchella</i>	14
Cuadro 3. Rendimiento de los extractos <i>P. pulchella</i>	14
Cuadro 4. Evaluación cualitativa antibacteriana de <i>P.pulchella</i>	16
Cuadro 5. CMI y CBM de los extractos de <i>P. pulchella</i>	17
Cuadro 6. CMI y CFM de los extractos <i>P. pulchella</i>	23
Cuadro 7. Inhibición del crecimiento radial en hongos miceliados.	23
Cuadro 8. Grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de <i>P. pulchella</i>	25
Cuadro 9. Reactivos y aspecto para determinar grupo de metabolito secundario.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	8
Figura 2. Crecimiento de la población bacteriana de <i>S. aureus</i>	19
Figura 3. Crecimiento de la población bacteriana de <i>E. coli</i>	20
Figura 4. Crecimiento de la población bacteriana de <i>K. pneumoniae</i>	21
Figura 5. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos de <i>P. pulchella</i> sobre hongos levaduriformes	22
Figura 6. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico <i>P. pulchella</i> sobre <i>A. niger</i>	24
Figura 7. Morfología de <i>Plumbago pulchella</i>	36
Figura 8. Ubicación de Santiago Quiotepec, Cuicatlán en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.....	37

RESUMEN

Las plantas medicinales han sido utilizadas a través de la historia para el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente en zonas rurales. *Plumbago pulchella* es una especie perteneciente a la familia Plumbaginaceae y es utilizada por las comunidades del Valle de Tehuacán-Cuicatlán para el tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciones oftálmicas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de *P. pulchella*. La especie fue colectada en Santiago Quiotepec, Cuicatlán, Oaxaca, que es una zona perteneciente al Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La actividad antimicrobiana se evaluó por los métodos de difusión y dilución en agar e inhibición del crecimiento radial. En los organismos más susceptibles se realizaron curvas de supervivencia microbiana. La composición química de los extractos se evaluó por métodos cualitativos de identificación de principales grupos de metabolitos secundarios. El extracto hexánico inhibió el crecimiento microbiano en un mayor número de cepas (ocho cepas bacterianas Gram positivas, seis Gram negativas, tres cepas de hongos levaduriformes y dos de hongos miceliados). Las cepas bacterianas más susceptibles al extracto hexánico fueron *Staphylococcus aureus* (CMI = <0.25 mg/mL, CBM = 0.25 mg/mL) y *S. epidermidis* (CMI = 0.25, CBM = 0.25 mg/mL), así como las cepas levaduriformes *Candida albicans* y *C. glabrata* (CMI = 1.0 mg/mL, CBM = 2.0 mg/mL). En las curvas de supervivencia microbiana, el extracto hexánico mostró efecto bactericida sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en la concentración de 6.0 mg/mL, el efecto se observó a las 2 y 6 horas respectivamente de estar en contacto el extracto con los microorganismos mencionados. En cuanto a la composición química, todos los extractos presentaron terpenos y fenoles. Los resultados permiten avalar el uso medicinal de *P. pulchella* en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

Palabras clave: *Plumbago pulchella*, antimicrobiano, bactericida, fungicida.

INTRODUCCIÓN

El consumo sistemático de plantas con atributos medicinales se remonta posiblemente a 2 millones de años, los primeros prosimios buscaban en las selvas los paliativos para eventuales disturbios orgánicos (Chifa, 2010). Desde tiempos prehispánicos hasta comienzos del siglo XIX se empezaron a seleccionar por medio de ensayos y error, lo cual les permitió conocer plantas que brindaran una opción terapéutica a las enfermedades, este conocimiento empírico pasó de generación en generación perfeccionándose a través del tiempo, por lo cual se denominó medicina tradicional al uso de plantas comunes para tratar problemas de salud (Lizcano y Vergara, 2008).

La sociedad humana cuenta con más de un sistema médico, uno de ellos es el tradicional, en el cual hay agentes de salud (terapeutas tradicionales) y tecnologías apropiadas (medicamentos y plantas) (Lagarriga, 2000), siendo la vida vegetal la que ha sido sustento y remedio para las especies de la vida animal, lo cual conlleva a la construcción de los conocimientos fitoterápicos (Chifa, 2010). El ser humano cuenta con una amplia herencia cultural respecto a las plantas medicinales ya que han formado parte de las costumbres ancestrales que durante mucho tiempo han sido los únicos medicamentos empleados y actualmente representan un gran mercado en el sector medicinal (farmacia y fitoterapia) (Juárez-Rosete *et al.*, 2013), porque es una medicina dinámica y permea en diversos sectores de la población, en menor o mayor medida, ya que recurren a ella de forma paralela a la medicina alópata (Lagarriga, 2000).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019) la medicina tradicional es el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.

El interés en la medicina tradicional a nivel mundial ha renacido de acuerdo con datos de la OMS (2003), por ejemplo, en China representa cerca del 40% de la atención de la salud, en Chile ha sido utilizada por el 71% de la población, en India el 65% de la población rural ha recurrido a ella para atender sus necesidades de atención primaria de salud. En países como Ghana, Mali y Nigeria la medicina herbaria representa el tratamiento de la primera línea de más del 60%, incluso en países desarrollados se han popularizado los medicamentos tradicionales, pues al menos una vez han consumido tales medicamentos el 48% de la sociedad en Australia y 42% en Estados Unidos de América. Por tanto, la medicina tradicional es catalogada como un

componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta (Jiménez, 2017). Sin embargo, hay pocas pruebas sistemáticas de su seguridad y eficacia, lo cual ha frenado el proceso de reglamentado y legislación, a pesar de ser muy accesible y asequible en países de bajos ingresos (OMS, 2003).

La medicina tradicional mexicana es un mosaico de piezas procedentes de culturas diferentes que han determinado históricamente el desarrollo de la cultura nacional. El nacimiento de esta se da posterior al mestizaje, tras la cosmovisión del mundo indígena que permitía determinar la causalidad natural o divina de la enfermedad y decidir los recursos y prácticas curativas a seguir (Jiménez, 2017). A raíz de la colonización española se estableció en el siglo XVI un diálogo entre los conocimientos terapéuticos sustentados en la medicina mesoamericana y aquellos de la medicina popular española cuando llegaron a estas tierras, así se consolidó paulatinamente como una medicina de tradición científica y desde el establecimiento de la Nueva España se erigió como la única y verdadera, siendo hasta el siglo XXI cuando ha habido cambios sustanciales gracias a las declaraciones de la OMS a favor de las medicinas tradicionales, pues fue de suma importancia para los pueblos y se propició que en México la Secretaría de Salud reconociera a la medicina tradicional (Fagetti, 2019).

En la población mexicana la vida vegetal constituye uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como en el suburbano, donde los servicios de atención médica son escasos, pues según Osuna *et al.*, (2005), representan la única alternativa médica para más de 40 millones de personas, es decir, existe en promedio de cuatro a cinco terapeutas tradicionales por cada médico alópata, ya que su uso a menudo puede lograr una rápida solución, sin embargo, es necesario aplicar el método científico de manera interdisciplinaria al estudio de las plantas que se utilizan como medicinales (Magaña *et al.*, 2010).

México tiene una rica tradición de uso de hierbas para el tratamiento de una multitud de dolencias, la farmacopea nacional incluye de 3,000 a 5,000 especies (González-Stuart y Rivera, 2009). La importancia de las plantas medicinales se hace más presente en la actualidad en países en vías de desarrollo y sobre todo en las comunidades indígenas donde más se practica la medicina tradicional porque poseen un profundo conocimiento de su ambiente y de los usos que se le pueden dar a las plantas, lo que a su vez contribuye a una base importante para la conservación de la biodiversidad global y su aprovechamiento de forma sostenible (Magaña *et al.*, 2010). Existen regiones en el país que sobresalen por la tradición herbolaria con la que cuenta

y por la riqueza de especies que presenta, un ejemplo es el Valle Tehuacán-Cuicatlán, que es una de las reservas bióticas más relevantes de México, siendo más del 25% de las plantas vasculares del valle las que se usan por diferentes comunidades humanas de la región (Canales *et al.*, 2006).

La eficacia terapéutica intrínseca que posee la medicina tradicional se debe a las propiedades que derivan de los principales activos de las plantas y que han sido utilizadas por generaciones enteras con el éxito deseado (Chifa, 2010). Estas propiedades farmacológicas existen gracias a los metabolitos secundarios que contienen (Balandrin *et al.*, 1985). Son moléculas comunes a todas las células como resultado del metabolismo primario del carbono, del cual derivan las principales rutas de su biosíntesis. Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de moléculas orgánicas, las cuales no tienen función directa en procesos como la respiración (Ávalos y Pérez-Urria, 2009) y se sintetiza en respuesta a presiones por estrés (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011), de tal manera que los metabolitos secundarios constituyen parte de las estrategias fundamentales que tienen las plantas para defenderse contra las condiciones de estrés abiótico y biótico, entre otras estrategias de defensa se encuentra la síntesis de enzimas con múltiples funciones, como la degradación de la pared celular de sus depredadores, al igual que el desarrollo de estructuras de defensa como espinas (Sepúlveda *et al.*, 2003). Las condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y déficit de agua pueden restringir el crecimiento de las plantas y reducir la velocidad fotosintética, por tanto, los carbohidratos no estructurados tienden a acumularse, lo que puede explicar el aumento de la síntesis de sustancias de defensa (Valares, 2011).

Los metabolitos secundarios son considerados como productos naturales, ya que tienen un importante y significativo valor medicinal y económico (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Son útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, aislamiento de sustancias bioactivas y de interés industrial como estructuras que pueden ser usadas en farmacología pues tienen la capacidad de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos (Ravelo y Estévez, 2009). Uno de los objetivos de la búsqueda de compuestos activos es el descubrimiento de compuestos contra hongos, virus o cepas bacterianas patógenas y resistentes a los antibióticos existentes, teniendo en cuenta que menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos son conocidos, y que millones de especies microbianas patógenas permanecen desconocidas (Evangelista-Martínez y Moreno-Enríquez, 2007).

La importancia del uso de las plantas medicinales como fuente para aislar compuestos bioactivos para su uso directo o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química para producir nuevas entidades con

mayor actividad y/o menor toxicidad ha logrado que casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta (Barquero, 2007). Son cruciales en el descubrimiento de sustancias líderes para el desarrollo de nuevos fármacos, pues su gran atractivo proviene de su historia biológica que deriva de interacciones entre los organismos y el medio, de manera que los compuestos químicos generados son esqueletos de carbono de origen natural, los cuales pueden lograr que la actividad biológica que desarrollen sea más específica que las exhibidas por productos puramente sintéticos, debido a que tienen la capacidad de interactuar con receptores moleculares (Fernández, 2015). Por consiguiente, representan un recurso invaluable que se ha utilizado para encontrar nuevas moléculas (Gurib-Fakim, 2006).

Los metabolitos secundarios de interés comercial y medicinal se dividen tres categorías según sus rutas biosintéticas en: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados o alcaloides (Cortés, 2005). Los terpenos son la familia más amplia de los compuestos de las plantas y de mayor importancia para su crecimiento y supervivencia, se derivan de la unión de moléculas de isopreno, que contiene cinco átomos de carbono, y son clasificados según las unidades de isopreno presentes. Se encuentran los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos que se producen en el citosol y retículo endoplásmico y los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos que se originan en los plástidos y se sintetizan principalmente a partir de la ruta del mevalonato (Sepúlveda *et al.*, 2003). Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos destacan sus efectos analgésicos, antibacterianos, antihepatóxicos, antioxidantes, antitumorales e inmunoestimulantes (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos (leucina, triptófano, lisina, arginina, tirosina, fenilalanina y ornitina), participan en la transmisión de señales del sistema nervioso e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, pues se intercalan en el DNA. En general se sintetizan en respuesta de defensa (Sepúlveda *et al.*, 2003), además son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina).

Los compuestos fenólicos incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Son compuestos químicos con al menos un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo, su importancia radica en que producen soporte mecánico a la planta, contribuyen a la coloración de los frutos y las flores, al igual que tiene la propiedad de proteger a los tejidos de la radiación ultravioleta (Valares, 2011). Existen dos rutas básicas implicadas en su biosíntesis: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico, siendo la primera la responsable de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas, la cual se deriva de reacciones a partir de

eritrosa 4-P y del ácido fosfoenolpiruvato, dando como resultado aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Actualmente se emplean los productos naturales de plantas y sus extractos para el tratamiento de enfermedades debido a un aumento de la fitoterapia por el incremento de la resistencia microbiana a algunos productos sintéticos, además de la evidencia de efectos colaterales no deseables y un elevado precio de los medicamentos de origen sintético (Prieto-González *et al.*, 2004). A nivel mundial no existe un sistema de regulación universal para ellos, sin embargo, en México los fitomedicamentos o medicamentos herbolarios, como los denomina la legislación, ya son reconocidos como medicamentos y regulados por la Ley General de Salud, no obstante, su consumo no está libre de efectos colaterales y se deben realizar pruebas de toxicidad (Romero-Cerecero y Tortoriello-García, 2007).

La investigación se ha enfocado a la búsqueda de nuevos sitios blanco de los compuestos ya conocidos, por consiguiente, el resultado ha sido el descubrimiento de agentes antimicrobianos nuevos, pues se requiere de nuevos productos para cubrir diferentes necesidades en las áreas médica, agrícola y alimenticia, a pesar de contar actualmente con metabolitos ya conocidos por sus actividades biológicas de interés comercial (Evangelista-Martínez y Moreno-Enríquez, 2007).

Una de las familias que se han utilizado para estos fines es la familia Plumbaginaceae la cual se ocupa popularmente en el tratamiento de los dolores en general, lepra, reumatismo, además actúa contra asma, bronquitis, catarros y resfriados, su actividad biológica como la antiinflamatoria y la antiviral presente en la familia está relacionada con la presencia de taninos en su composición química (Ribeiro de Paiva *et al.*, 2002a). Las especies de la familia Plumbaginaceae son mayormente hierbas perennes y arbustos, autoportantes o trepadoras, se distribuyen por todo el mundo, agrupa 27 géneros y 836 especies (Devesay y Castroviejo, 2019).

El género *Plumbago* perteneciente a la familia Plumbaginaceae, agrupa plantas herbáceas o leñosas y son reconocidas como plantas de importancia ornamental. Se reconocen 10 a 12 especies y se usan en la medicina tradicional (Calderón de Rzedowski, 1996). Algunos trabajos de actividad antimicrobiana de especies del género *Plumbago* se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Antecedentes de la actividad biológica de especies del género *Plumbago*.

Autores	Contribución
Ahmad <i>et al.</i> , 1998	Reportaron que los extractos acuoso y alcohólico de las raíces <i>Plumbago zeylanica</i> inhibieron el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Proteus vulgaris</i> .
Ribeiro de Paiva <i>et al.</i> , 2002b	En el estudio del perfil cromatográfico de <i>P. scandens</i> y de <i>P. auriculata</i> . Observaron principalmente naftoquinonas y flavonoides, relacionaron su actividad biológica con la presencia de la naftoquinona plumbagina, aislada principalmente de las raíces.
Ribeiro de Paiva <i>et al.</i> , 2003	Analizaron la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de un extracto clorofórmico de <i>P. scandens</i> sobre <i>S. aureus</i> y <i>Candida albicans</i> , reportaron que la naftoquinona plumbagina es el compuesto responsable de la actividad inhibitoria.
Ibarra-Rivera <i>et al.</i> , 2018	Determinaron la composición fitoquímica, la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana de <i>P. auriculata</i> de un extracto metanólico de las hojas. Reportaron la presencia de la mayoría de los metabolitos en estudio (excepción de saponinas y cumarinas), sin embargo, no fue posible determinar la inhibición en el crecimiento de las bacterias.

Las especies del género *Plumbago* tienen potencial antimicrobiano, sin embargo, la investigación en este sentido es insuficiente, y en México hay miembros de este género que son utilizadas en comunidades donde la práctica de la medicina tradicional constituye el principal recurso de atención de la salud, tal es el caso de *Plumbago pulchella* Boiss. (Figura 1). Se utiliza en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán en el tratamiento de malestares relacionados con procesos infecciosos; se emplea para cuidados posteriores al parto, dolor de muelas e infecciones en los ojos (BDMTM, 2009). En la comunidad de Santiago Quiotepec, Oaxaca la población la utiliza para infecciones estomacales.

P. pulchella es conocida comúnmente como “cola de iguana”, “pañete”, “hierba del negro”, “chilillo”. Esta especie es nativa de México y crece en matorrales xerófilos, pastizales, así como en bosque tropical caducifolio y de pino-encino (BDMTM, 2009). Se encuentra abundantemente tanto en Guanajuato como en Querétaro y Michoacán en variados hábitats. Se encuentra en floración prácticamente durante todo el año, con más frecuencia en la temporada lluviosa. Es una planta herbácea perenne, regularmente de 50 centímetros a un

metro de alto de inflorescencias terminales dispuestas en racimos espiciformes de 10 a 20 cm de largo, con flores muy cortamente pediceladas (Calderón de Rzedowski, 1996) (Apéndice 1).

Cabe mencionar que de la especie no se han reportado estudios en los que se haya verificado su potencial antimicrobiano, ni de su composición química, únicamente se ha encontrado el trabajo de Cortés, quien en 2005 evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de tallos y hojas y reportó efecto sobre *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, el extracto inhibió completamente el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, mientras que sobre *S. typhimurium* fue parcialmente activo. Además, reportó flavonoides en el extracto, el cual produjo citotoxicidad en células HeLa de cáncer cérvico uterino, el compuesto activo aislado fue identificado como plumbagina (naftoquinona). Algunos compuestos que se han aislado y caracterizado de la especie son de tipo flavonoide como ramnósido de azaleatín, glucósidos de delfinidín y pulchellidín en los pétalos y plumbazín en las hojas (BDMTM, 2009). A pesar de lo anterior, no hay suficientes estudios farmacológicos que validen su uso tradicional; por consiguiente, el presente trabajo contribuye al conocimiento sobre la actividad biológica de esta planta, por lo cual el propósito del presente trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana de *P. pulchella* sobre microorganismos de importancia clínica.



Figura 1. *Plumbago pulchella* Boiss. (Imagen tomada de Lezama, 2000).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En vista de que las plantas forman parte del recurso terapéutico tradicional a lo largo del tiempo pues se les ha comprobado actividad biológica de interés comercial ¿Los extractos de *P. pulchella* presentaran actividad antimicrobiana?

HIPÓTESIS

Si las especies del género *Plumbago* son utilizadas tradicionalmente para aliviar problemas de salud como infecciones microbianas y se ha reportado la actividad antimicrobiana de especies como *Plumbago zeylanica*, *P. scandens* y *P. auriculata*, entonces los extractos de *P. pulchella* tendrán efecto antimicrobiano sobre diferentes microorganismos patógenos en pruebas *in vitro*.

OBJETIVOS

General

- ∩ Evaluar la actividad antimicrobiana de *Plumbago pulchella*.

Particulares

- ∩ Obtener la concentración de sólidos solubles en solventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) de *P. pulchella*.
- ∩ Determinar cualitativamente la actividad antimicrobiana de los extractos de *P. pulchella*.
- ∩ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Bactericida Mínima (CBM), Concentración Fungicida Mínima (CFM) y Concentración Fungicida 50 (CF₅₀) de los extractos que inhiben el crecimiento de los microorganismos susceptibles.
- ∩ Determinar el efecto inhibitorio de los extractos de *P. pulchella* sobre la curva de sobrevivencia en las poblaciones microbianas más susceptibles.
- ∩ Identificar cualitativamente los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos bioactivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colecta

El material vegetal (parte aérea) se colectó en la localidad de Santiago Quiotepec, en el municipio de Cuicatlán, Oaxaca, perteneciente a la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán (Figura 11, Apéndice 2). Un ejemplar de la especie se depositó en el herbario IZTA de la FES Iztacala para su identificación taxonómica y la obtención del número de registro.

2. Obtención de los extractos

El material vegetal se secó a temperatura ambiente. Para la preparación de los extractos se trituró y peso. Los extractos se obtuvieron por el método de maceración utilizando solventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) (Domínguez, 1973), el exceso de solventes se destiló a presión reducida, posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente en charolas de vidrio para su total evaporación (Apéndice 3). El rendimiento de los extractos se determinó con relación al peso seco de la planta.

3. Actividad antibacteriana

a) Microorganismos utilizados en los bioensayos

Se utilizaron las cepas bacterianas de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *E. gergoviae* ACCT 33028, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Escherichia coli* 82 MR, *E. coli* CUSI, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 7251, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Staphylococcus aureus* 23 MR, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* cc, *S. aureus* CUSI, *S. aureus* FES-C, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* FES-C y *Vibrio colerae* ATCC 39540.

b) Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana cualitativa se determinó por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Koneman *et al.*, 1996). Los inóculos bacterianos se ajustaron al estándar 0.5 de Mc Farland (1×10^8 UFC/mL). Se prepararon los discos de papel filtro de 5mm de diámetro y se impregnaron con 2 mg de cada extracto. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol y como control negativo sensidiscos con 10 µL de los solventes utilizados para la maceración de los extractos. Los inóculos se sembraron en placas

con agar Müller-Hinton, los sensibilizadores se colocaron sobre la superficie del agar y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Los halos de inhibición se reportaron en mm. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 4).

c) Determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana cuantitativa se determinó mediante la micro técnica de dilución en caldo, en placas de 96 pozos, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) (Koneman *et al.*, 1991). Los inóculos se prepararon en caldo Müller-Hinton en concentración de 1×10^5 UFC/mL. Las concentraciones de extracto probadas fueron: 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 mg/L y un testigo sin extracto. Como control positivo se utilizó cloranfenicol (30 µg/mL) y como control negativo se colocaron pozos con caldo Müller Hinton y el solvente empleado para disolver el extracto. Para determinar la CMI se consideraron los pozos donde se observó una disminución drástica del crecimiento microbiano y la CBM fue la concentración en la que los pozos se observaron sin turbidez ni color. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 5).

d) Curvas de crecimiento bacteriano

El efecto microbicida de los extractos se determinó en curvas de supervivencia (Muroi *et al.*, 1993), sobre los microorganismos más sensibles, se monitoreo el crecimiento en siete tiempos durante 24 horas, mientras se expusieron a diferentes concentraciones de los extractos (1/2 CMI, CMI y CBM) y un grupo testigo (Apéndice 6).

4. Actividad antifúngica

a) Microorganismos utilizados en los bioensayos.

1. Hongos levaduriformes: *Candida albicans* 17MR, *C. glabrata*, *C. tropicalis*.
2. Hongos miceliados: *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* CBB-H-265, *F. sporotrichum*.

b) Determinación cualitativa de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica cualitativa de los extractos para los hongos levaduriformes se llevó a cabo mediante el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Koneman, 1991). La evaluación se realizó de la misma forma

que para las bacterias, solo que en este caso se utilizó agar PDA. Como control positivo se utilizaron discos con 30 µg de Nistatina.

La actividad antifúngica cualitativa de los extractos se evaluó por el método de inhibición de crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se usaron sensidiscos con 2mg de los extractos. Se inoculó 1 mm² de micelio del hongo en placas con agar PDA, Como controles positivo y negativo se emplearon 60 µg/disco de ketoconazol y 10 µL/disco de los solventes, respectivamente. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 a 96 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se reportaron como positivos si se observaban zonas de inhibición en formas de medias lunas (Apéndice 7a).

c) Determinación cuantitativa de la actividad antifúngica

Mediante la determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos para las cepas de hongos levaduriformes se determinó la CMI y la concentración fungicida mínima (CFM) empleando la misma técnica que para las bacterias, en este caso se empleó caldo Sabouraud.

Para los hongos miceliados se realizó el método de dilución en agar (Wang y Bun, 2002). Se utilizaron placas de cultivo de 24 pozos con agar PDA y diferentes concentraciones de los extractos (0.125 a 3.0 mg/mL). Se inoculó un 1 mm² del micelio en cada pozo. Como control negativo se colocaron placas con agar conteniendo los solventes utilizados. Las placas se incubaron de 24 a 72 horas a 28 °C. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. Se calcularon los porcentajes de inhibición para determinar la CFM (100% inhibición del hongo) y CF₅₀ (50% inhibición) (Apéndice 7b).

5. Detección de los principales grupos de metabolitos secundarios

Se determinó cualitativamente la presencia de fenoles, saponinas, alcaloides, terpenos y taninos según las metodologías descritas por Domínguez, (1973) y Robles-García et al., (2016). Para estas pruebas se utilizó cloruro férrico para fenoles, los reactivos de Dragendorff y Mayer para alcaloides, vainillina y H₂SO₄ para terpenos, agua destilada para saponinas, α-naftol y HCl para glucósidos, NaOH y HCl para cumarinas, reactivo de Liebermann-Buchard para triterpenos y esteroides, hidróxido de sodio para flavonoides y gelatina al 1% para taninos, (Apéndice 8).

6. Análisis estadístico

Los datos del análisis de la actividad antimicrobiana se analizaron estadísticamente por medio de ANOVA multifactorial mediante el software Stastica versión 6.0 y un análisis de regresión lineal para conocer la CF_{50} y CF_{100} de los hongos miceliados.

RESULTADOS

1. Colecta

Plumbago pulchella es usada en Santiago Quiotepec, Oaxaca para afecciones en las que se encuentra involucrado algún proceso infeccioso. Los datos etnobotánicos y de colecta se muestran a continuación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Datos etnobotánicos de *P. pulchella*

Nombre científico:	<i>Plumbago pulchella</i>
Nombre común:	Cola de iguana, pañete, chilillo tradicional.
Zona de colecta:	Santiago Quiotepec, Cuicatlán, Oaxaca.
Usos:	Para cuidados posteriores al parto, contra el dolor de muelas, infecciones en los ojos.
Modo de uso:	Infusiones y uso directo sobre la zona afectada.
Colector:	Orozco Martínez Julieta
No. de registro	JOM066

2. Rendimiento de los extractos

El extracto metanólico presentó el mayor porcentaje de rendimiento con 11.48%, correspondientes con 3.41 g. El extracto con menor porcentaje de rendimiento fue el hexánico con 0.86% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos de *P. pulchella*

	(g)	(%)
Extracto		
Hexánico	0.26	0.86
Acetato de etilo	0.56	1.90
Metanólico	3.41	11.48

El rendimiento en porcentaje se calculó con respecto al peso seco del material vegetal (29.7 g).

3. Actividad antibacteriana

3.1. Evaluación cualitativa

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los extractos de *P. pulchella* mostró un efecto positivo al inhibir el crecimiento de 14 cepas (ocho Gram positivas y seis Gram negativas) (Cuadro 4). Los tres extractos fueron activos sobre las cepas *E. faecalis* ATCC 1450 y *S. aureus* 23MR. El extracto hexánico inhibió un mayor número de cepas (ocho Gram positivas y cinco Gram negativas). Los mayores halos de inhibición del extracto hexánico se observaron en *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. aureus* cc (27.50 ± 2.12 y 23.50 ± 0.71 mm respectivamente). El extracto acetato de etilo inhibió el crecimiento ocho cepas (cuatro Gram positivas y cuatro Gram negativas). Los mayores halos de inhibición de este extracto se observaron en *S. epidermis* FES-C y *S. aureus* 23MR (10.00 ± 1.41 y 8.00 ± 1.41 mm respectivamente). Por último, el extracto metanólico inhibió un menor número de microorganismos (cinco cepas Gram positivas y una Gram negativa). Estos resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (cloranfenicol) ($P < 0.05$).

Cuadro 4. Evaluación cualitativa antibacteriana de *P. pulchella*

Microorganismo	Control positivo (Cloranfenicol)	Extractos		
	(25 µg/disc)	Hexánico (2 mg/disco)	Aceto de etilo (2 mg/disco)	Metanólico (2 mg/disco)
<i>Staphylococcus aureus</i> cc*	16.33 ± 0.047	23.50 ± 0.71	ND	9.00 ± 0.00
<i>S. aureus</i> 23MR*	22.33 ± 0.047	17.00 ± 0.00	15.50 ± 0.70	8.00 ± 1.41
<i>S. aureus</i> FES-C*	22.33 ± 0.47	21.00 ± 0.00	ND	10.00 ± 1.41
<i>S. aureus</i> ATCC 29213*	20.00 ± 0.00	6.50 ± 0.71	NA	NA
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228*	18.00 ± 0.82	27.50 ± 2.12	ND	9.00 ± 0.00
<i>S. epidermidis</i> FES-C*	28.00 ± 0.00	22.00 ± 1.41	24.00 ± 4.24	NA
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 14506*	16.00 ± 0.82	16.50 ± 0.70	12.5 ± 2.12	7.33 ± 1.76
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240*	32.00 ± 0.00	19.50 ± 3.53	15.00 ± 0.00	NA
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 7251**	19.33 ± 0.47	8.00 ± 1.41	NA	NA
<i>S. typhi</i> ATCC 19430**	20.00 ± 0.00	10.50 ± 0.71	11.50 ± 0.71	NA
<i>Escherichia coli</i> 82MR**	22.67 ± 0.47	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	NA
<i>E. coli</i> CUSI**	23.00 ± 0.00	7.50 ± 0.71	6.50 ± 0.71	NA
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724**	22.67 ± 0.47	16.50 ± 2.12	14.50 ± 0.71	NA
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883**	27.00 ± 0.00	NA	NA	6.00 ± 0.00

Los resultados se presentan como el promedio de los halos de inhibición (mm) de tres repeticiones ± DE.

*Bacterias Gram positivas, **Bacterias Gram negativas; NA: No activo; ND: No determinado

3.2. Evaluación cuantitativa

En la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana el extracto hexánico de *P. Pulchella* fue el que mayor actividad presentó, pues mostró los valores más bajos de CMI y CBM (Cuadro 5), siendo la cepa *S. aureus* cc la más susceptible al extracto (CMI y CBM < 0.25 mg/mL), seguida de *S. epidermidis* ATCC 12228 (0.25 mg/mL y 0.5 mg /mL respectivamente) y *S. aureus* ATCC 29213 (0.25 mg/mL y 0.5 mg/mL, respectivamente). Para el extracto acetato de etilo, la única cepa con un valor de CMI menor a la concentración máxima probada fue *S. aureus* 23MR, con un valor de 0.5 mg/mL.

Cuadro 5. CMI y CBM de los extractos de *P. pulchella*.

Cepa	Extractos					
	Hexánico		Acetato de etilo		Metanólico	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> cc*	<0.25	0.25	Na	Na	3.00	>3.00
<i>S. aureus</i> 23MR*	0.25	>3.00	0.50	>2.00	3.00	>3.00
<i>S. aureus</i> FES-C*	0.50	0.75	Na	Na	3.00	>3.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213*	0.25	0.50	Na	Na	Na	Na
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228*	0.25	0.50	Na	Na	>3.00	>3.00
<i>S. epidermidis</i> FES-C*	3.00	3.00	>2.00	>2.00	Na	Na
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 14506*	1.50	>3.00	>2.00	>3.00	>3.00	>3.00
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240*	3.00	>3.00	>2.00	>2.00	Na	Na
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 7251**	3.00	>3.00	Na	Na	Na	Na
<i>S. typhi</i> ATCC 19430**	3.00	>3.00	>2.00	>2.00	Na	Na
<i>Escherichia coli</i> 82MR**	3.00	>3.00	>2.00	>2.00	Na	Na
<i>E. coli</i> CUSI**	1.50	>3.00	>2.00	>2.00	Na	Na
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724**	3.00	>3.00	>2.00	>2.00	Na	Na
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883**	Na	Na	Na	Na	>3.00	>3.00

Las concentraciones se expresan en mg/mL. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; CBM: Concentración Bactericida Mínima; Na: No activo; *Bacterias Gram positivas, **Bacterias Gram negativas.

3.3. Curvas de crecimiento bacteriano

En la figura 2 se puede observar el efecto del extracto hexánico de *P. pulchella* sobre el crecimiento de *S. aureus*. La población bacteriana expuesta mostró disminución de su crecimiento (Figura 2a) en comparación con el testigo a partir de las primeras horas, con la concentración del extracto de 0.75 mg/mL se observa un efecto bacteriostático después de las dos horas, incrementando el porcentaje de inhibición de 24.16% a 35.22%, sin embargo, a las 12 horas se observa recuperación del crecimiento bacteriano, disminuyendo el porcentaje de inhibición de 48.83% a 45%, lo cual también sucedió en la concentración de 1.5 mg/mL del extracto, pasando de 85.96% a 70.4%. En cambio, la población bacteriana de *S. aureus* al estar expuesta a la 6.0 mg/mL del extracto exhibió un efecto bactericida a partir de las 6 horas, pasando de 51.75% a 99.99% de inhibición sin que se presentara recuperación del crecimiento bacteriano a lo largo de las 18 horas restantes.

El efecto del extracto acetato de etilo de *P. pulchella* sobre el crecimiento de *S. aureus* (Figura 2b), fue bacteriostático desde las primeras dos horas del experimento, no obstante, la población bacteriana mostró una recuperación en su crecimiento con la concentración de 0.25 mg/mL a partir de las seis horas de exposición, pasando de un porcentaje de inhibición de 40.55% a 22.72%. De igual manera, con la concentración de 0.5 mg/mL a las 12 horas de exposición se mostró una recuperación en el crecimiento, disminuyendo el porcentaje de inhibición de 81.91% a 36.6%.

El crecimiento de *S. aureus* bajo el efecto del extracto metanólico de *P. pulchella* (Figura 2c), fue disminuido con todas las concentraciones probadas, al observarse un efecto bacteriostático del extracto sobre el desarrollo de la población bacteriana desde las primeras 2 horas, con la concentración de 6.0 mg/mL después de las 12 horas se observó un aumento gradual en el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (66.7% a 87%) a las 24 horas del tratamiento, asimismo no se observó recuperación del crecimiento de la población bacteriana en ninguna de las concentraciones probadas.

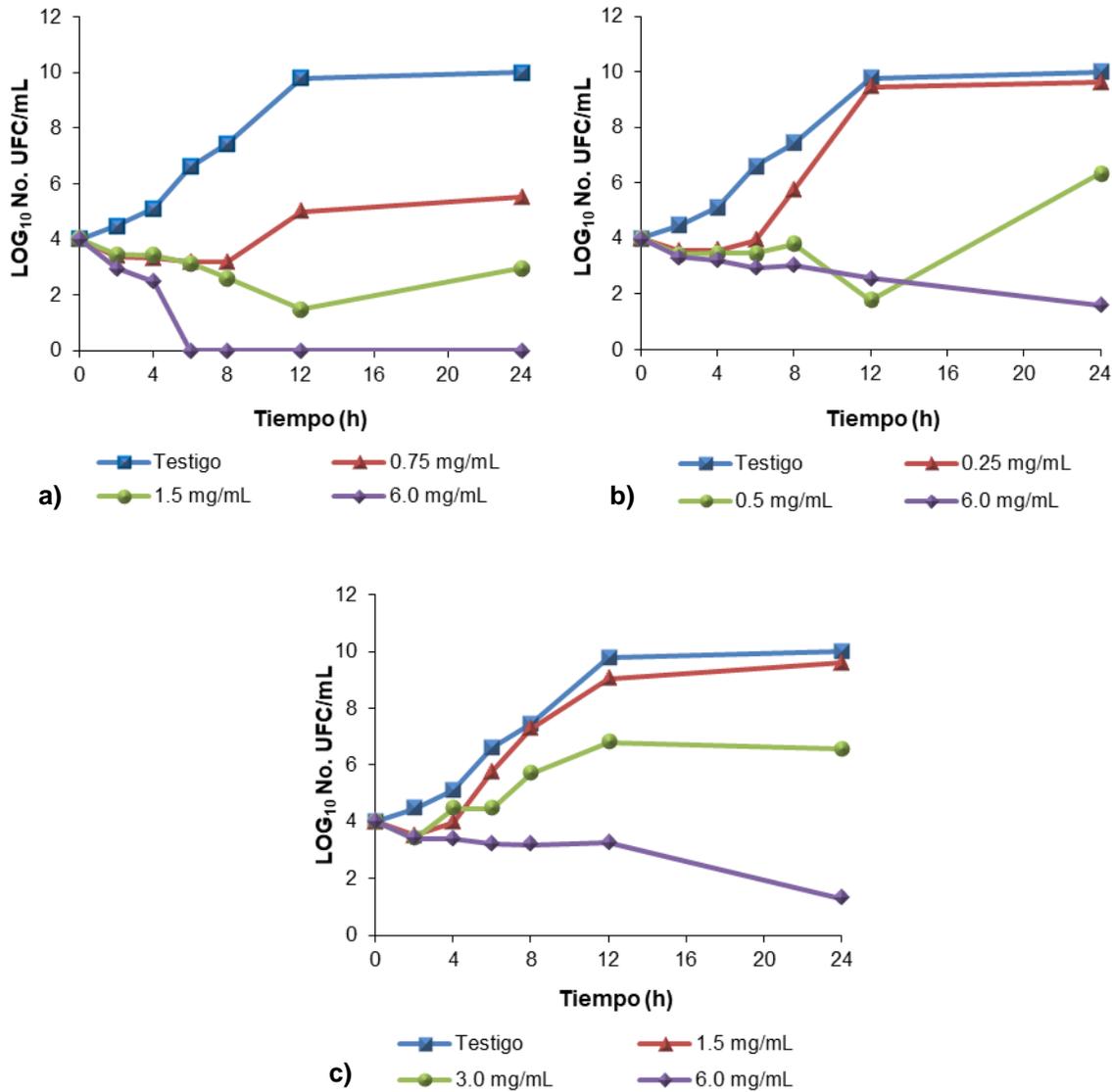


Figura 2. Crecimiento de la población bacteriana de *S. aureus* expuesta a distintas concentraciones de los tres extractos probados de *P. pulchella*, durante 24 horas. a): extracto hexánico, b) extracto acetato de etilo y c) extracto metanólico.

El efecto del extracto hexánico de *P. pulchella* sobre el crecimiento de la población bacteriana de *E. coli* se observa en la figura 3a, exhibe que con la concentración de 0.75 mg/mL hay un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de la cepa, sin embargo, se muestra una recuperación de su crecimiento a partir de las 2 horas del tratamiento disminuyendo el porcentaje de inhibición de 42.54% a 0.76%, en contraste con las concentraciones de 1.5 y 6.0 mg/mL del extracto que provocaron un efecto bactericida sobre la cepa, al eliminar el 99.99% de la población bacteriana desde las primeras dos

horas en ambas concentraciones sin recuperación del crecimiento de la cepa durante las 24 horas.

El crecimiento de la población bacteriana *E. coli* expuesta al extracto acetato de etilo de *P. pulchella* (Figura 3b) fue similar en las concentraciones de 3.0 y 6.0 mg/mL, manteniendo constante el crecimiento de la cepa bacteriana a partir de las 12 horas. Además, se exhibe que todas las concentraciones probadas tuvieron un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de la cepa, siendo más visible el descenso del crecimiento en la concentración de 9.0 mg/mL a las 12 horas, pasando de un porcentaje de inhibición de 49.24% a 76.93%.

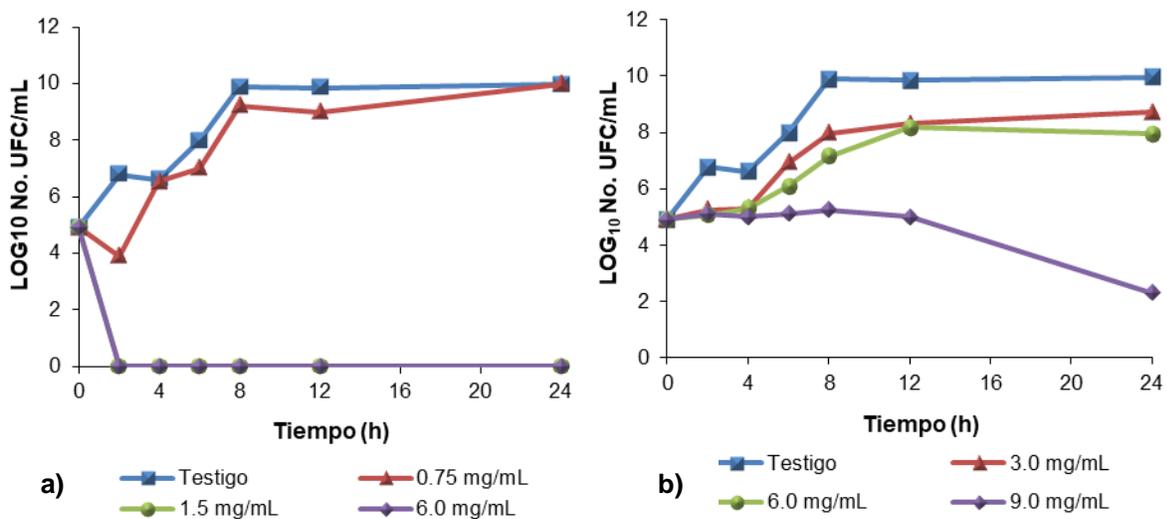


Figura 3. Crecimiento de la población bacteriana de *E. coli* expuesta a distintas concentraciones de los tres extractos probados de *P. pulchella*, durante 24 horas. a): extracto hexánico y b) extracto acetato de etilo.

El crecimiento de *K. pneumoniae* expuesta al extracto metanólico *P. pulchella* (Figura 4) permite apreciar que las concentraciones de 3.0 y 6.0 mg/mL actuaron como bacteriostáticos del crecimiento de la población bacteriana desde las dos horas del experimento, respecto a la concentración de 3.0 mg/mL hubo una recuperación gradual de la población bacteriana disminuyendo el porcentaje de inhibición de 22% a 13.1% desde las 4 a las 12 horas, a la mismas horas la concentración de 9.0 mg/mL mostró efecto bactericida.

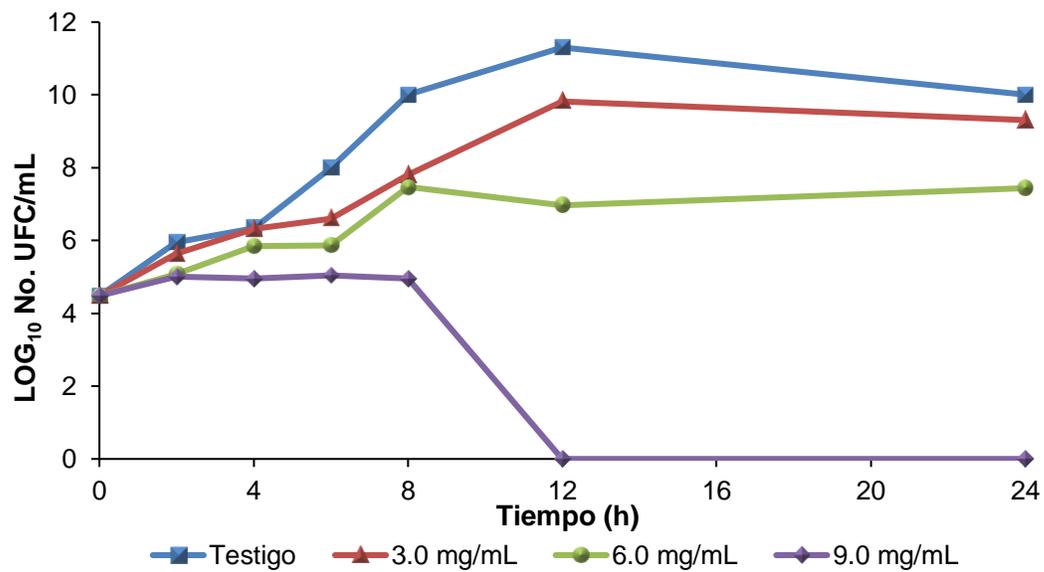


Figura 4. Crecimiento de la población bacteriana de *K. pneumoniae* expuesta a concentraciones del extracto metanólico de *P. pulchella*, durante 24 horas.

4. Actividad antifúngica

4.1. Evaluación cualitativa sobre hongos levaduriformes

Los extractos hexánico y acetato de etilo de *P. pulchella* mostraron un efecto inhibitorio en las tres cepas de *Candida* evaluadas (Figura 5). Los mayores halos de inhibición se observaron en *C. albicans* 17 MR (18.00 ± 2.65 y 14.00 ± 0.71 mm para los extractos hexánico y acetato de etilo respectivamente). Se observa que el extracto hexánico produjo halos de inhibición mayores sobre las cepas evaluadas en comparación con el extracto acetato de etilo. Estos resultados fueron estadísticamente significativos al ser comparados con el control positivo (Nistatina) ($P < 0.05$).

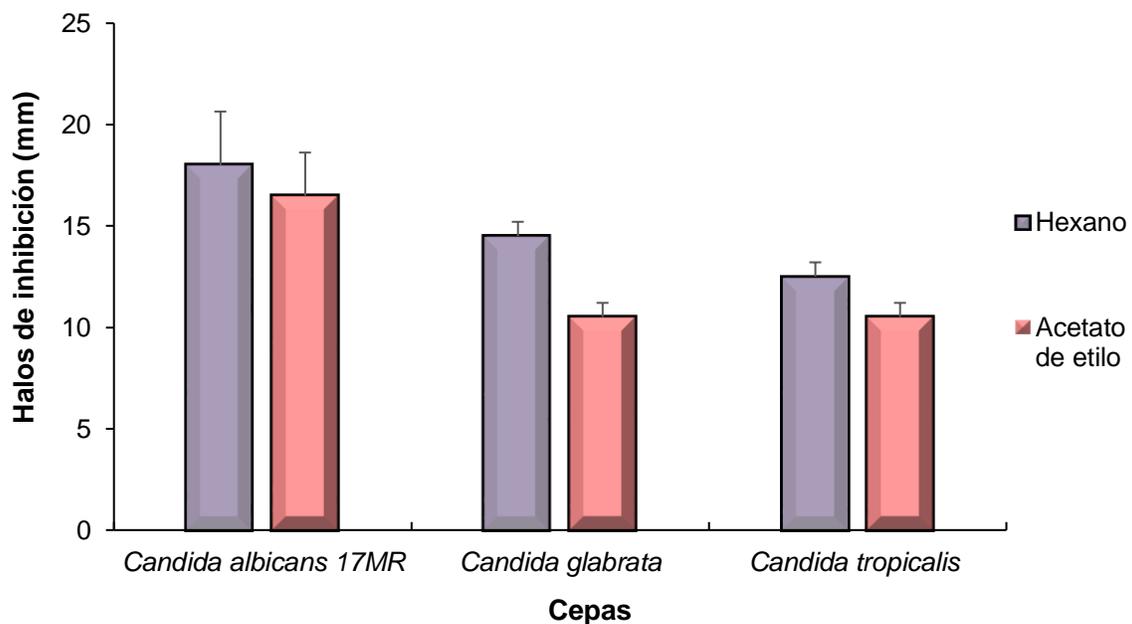


Figura 5. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos de *P. pulchella* sobre hongos levaduriformes. Los resultados se presentan como el promedio de los halos de inhibición (mm) de tres repeticiones \pm DE.

4.2. Evaluación cuantitativa sobre hongos levaduriformes

El extracto hexánico fue el más activo al presentar los valores menores de CMI y CFM (Cuadro 6), siendo las cepas más susceptibles *C. albicans* 17MR y *C. glabrata*, con valores de CMI = 1.0 mg/mL y CFM = 2.0 mg/mL.

Cuadro 6. CMI y CFM de los extractos *P. pulchella*.

Cepa	Hexánico		Acetato de etilo	
	CMI	CFM	CMI	CFM
<i>C. albicans</i> 17MR	1.0	2.0	2.0	>2.0
<i>C. glabrata</i>	1.0	2.0	Na	Na
<i>C. tropicalis</i>	2.0	3.0	2.0	>2.0

Las concentraciones se expresan en mg/mL. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; CFM: Concentración Fungicida Mínima; Na: No activo.

4.3. Evaluación cualitativa sobre hongos miceliados

En el caso de los hongos miceliados, en la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica, los tres extractos mostraron inhibición del crecimiento radial en *A. niger* y *F. moniliforme* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Inhibición del crecimiento radial en hongos miceliados.

Cepa	Extractos		
	Hexánico	Acetato de etilo	Metanólico
<i>A. niger</i>	•	•	•
<i>F. moniliforme</i> CDBB-H-265	•	•	•
<i>F. sporotrichum</i>	nd	nd	nd
<i>T. mentagrophytes</i>	nd	nd	nd

•: Prueba positiva, nd: no determinado.

4.4. Evaluación cuantitativa sobre hongos miceliados

El extracto metanólico mostró sobre la cepa *A. niger* un porcentaje de inhibición del 99.99% en la concentración más alta probada (4 mg/mL) y un porcentaje de inhibición del 9.09% en la concentración experimental más baja (0.25 mg/mL), este extracto mostró una CF_{50} de 0.82 mg/mL y una CF_{100} de 4.0 mg/mL (CF_{100} teórico, usando la ecuación de la recta fue de 3.38 mg/mL) (Figura 6).

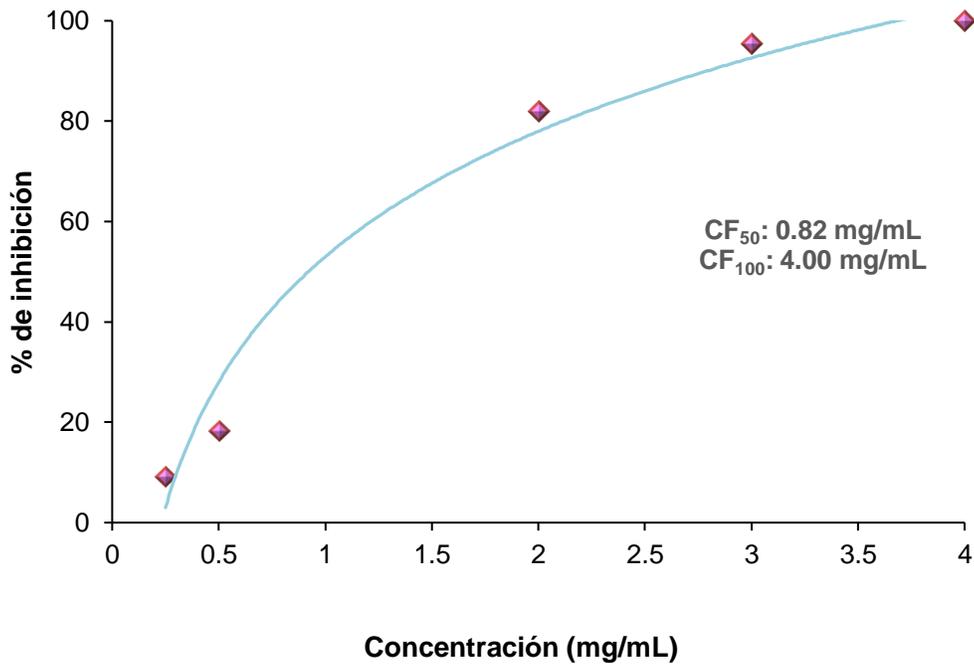


Figura 6. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico *P. pulchella* sobre *A. niger*.

5. Detección de los principales grupos de metabolitos secundarios.

En la caracterización fitoquímica de los principales grupos de metabolitos secundarios, en los extractos hexánico y acetato de etilo se detectaron los mismos grupos (fenoles, terpenos, esteroides y alcaloides). En el extracto metanólico se detectaron fenoles, terpenos y saponinas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *P. pulchella*.

Grupo de metabolitos secundarios	Extracto		
	Hexánico	Acetato de etilo	Metanólico
Fenoles	✓	✓	✓
Saponinas	-	-	✓
Terpenos	✓	✓	✓
Esteroides	✓	✓	-
Alcaloides	✓	✓	-
Glucósidos	-	-	-
Cumarinas	-	-	-
Flavonoides	-	-	-
Taninos	-	-	-

✓: Presencia; -: ausencia.

DISCUSIÓN

Plumbago pulchella es una especie herbácea perenne, se encuentra en matorrales xerófilos, pastizales, bosques tropicales caducifolios, a menudo se le puede hallar en la vegetación secundaria (Calderón de Rzedowski, 1996) y es de hábito ruderal, lo que quiere decir que crece en hábitats perturbados y se encuentra adaptada a condiciones de estrés biótico y abiótico (Alemán *et al.*, 2012) (Apéndice 1). Las condiciones ambientales del valle de Tehuacán-Cuicatlán propicia el crecimiento de *P. pulchella*, debido a su clima árido a semiárido, con altas temperaturas (mayores a 22 °C) (Arriaga, 2000) (Apéndice 2). Estas condiciones favorecen el desarrollo de las especies del género *Plumbago*, las cuales han sido utilizadas tradicionalmente para para aliviar malestares de salud, tal es el caso de *P. pulchella* la cual es empleada por los habitantes de algunas comunidades de Tehuacán-Cuicatlán en el tratamiento de enfermedades en las que se encuentra involucrado algún proceso infeccioso (Cuadro 2). En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de la especie. Respecto a los rendimientos de los extractos, se obtuvo mayor porcentaje de rendimiento del extracto metanólico, lo que indica que la especie posee una alta proporción de componentes polares (como saponinas y fenoles).

La actividad antibacteriana de *P. pulchella* exhibe que los extractos hexánico y acetato de etilo mostraron una mejor respuesta de inhibición sobre cepas de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. El extracto con el mayor efecto antibacteriano fue el hexánico, por lo que puede considerarse que posee actividad antibacteriana de amplio espectro, pudiendo actuar a diferentes niveles en la estructura de los microorganismos, por ejemplo, en las membranas, sobre la síntesis de la pared celular o sobre la síntesis de proteínas, ya sea interrumpiéndola o afectando el genoma bacteriano a través de los ribosomas (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Sin embargo, el extracto con menor actividad fue el metanólico, es decir, la mayoría de los compuestos activos de los extractos de *P. pulchella* son de mediana a baja polaridad.

Las cepas más susceptibles fueron *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis* (Cuadro 4), ya que su crecimiento fue inhibido por los tres extractos, estas cepas han mostrado rechazo

a los fármacos, en el caso *S. aureus* el 90% de los los casos clínicos han mostrado resistencia a los antibióticos, según Rincón *et al.*, (2014) se debe a que el antibiótico se queda en las capas externas de peptidoglicano sin llegar al citoplasma, esto debido a una alteración en la fisiología celular aumentando el engrosamiento de la pared, lo que provoca su síntesis normal aun con el antibiótico. Respecto a las bacterias Gram negativas, los antibióticos en su mayoría actúan sobre la membrana externa de los microorganismos, ejercen acción como detergentes sobre la porción fosfolipídica de la membrana, sin embargo, el paso de los antibióticos a través de la capa lipídica es más complejo (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Respecto a la evaluación cuantitativa, las cepas bacterianas más susceptibles a los extractos fueron las Gram positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* y *E. faecalis*), lo que sugiere que los extractos actúan principalmente sobre la pared celular bacteriana, aunque el mecanismo de acción aun es desconocido.

De las bacterias Gram negativas *E. coli* fue la más susceptible al extracto hexánico, ya que en ella se obtuvieron los valores de CMI menores (Cuadro 5). Esta cepa tiene diversos mecanismos de resistencia bacteriana, ejemplo de ello es la producción de indol al hidrolizar al triptófano con la enzima triptofanasa, en la fase estacionaria del crecimiento, el cual actúa como una señal capaz de modificar funciones celulares, tales como patogenicidad y provocar cambios en la expresión génica; asimismo puede medir el paso de antibióticos por medio de porinas en la membrana y así evitar la acción del antibacteriana a nivel citoplasmático o de la pared celular (Troncoso *et al.*, 2017), impidiendo llegar al punto diana o con la alteración de sus receptores por parte de la misma bacteria sobre su el sitio blanco haciendo difícil la acción del antibiótico (Cuadros, 2010). A pesar de lo mencionado, el mecanismo de acción del extracto sobre la cepa es incierto, porque se requiere hacer pruebas que permitan observar daños estructurales y funcionales en la célula microbiana, no obstante, el extracto hexánico contiene metabolitos secundarios no polares como los terpenos hidrocarbonados que pueden tener afinidad con los componentes de la membrana externa bacteriana y desestabilizarla al intercalarse entre los fosfolípidos y causar la muerte bacteriana (Vignoli y Seija, 2008).

Los resultados de la evaluación cuantitativa mostraron que el extracto hexánico es el que posee los valores de CMI menores y, por tanto, representa un producto de la flora medicinal mexicana con potencial antibacteriano, lo cual a su vez se corroboró por el efecto bactericida que mostró en los ensayos donde se evaluó la cinética de las bacterias (Figura 2a), en los que se observó la inhibición de *S. aureus* a las seis horas de exposición del microorganismo al extracto, con la concentración de 6.0 mg/mL, es decir, se observa un efecto bactericida. El rápido decaimiento de la población microbiana se observó mediante una pendiente negativa entre las cuatro y seis horas de exposición del microorganismo al extracto, lo que sugiere que el extracto posee varios blancos microbianos, en comparación con el resto de las concentraciones experimentales, en donde solo se observó efecto bacteriostático comparados con el grupo testigo, en este último se observó el crecimiento exponencial típico de las bacterias. Cabe mencionar, que no se encontraron estudios previos de alguna especie del género *Plumbago* donde se analice la actividad antibacteriana con extractos de baja o nula polaridad, a pesar de ello, se puede inferir que el potencial antibacteriano de los compuestos contenidos en extracto hexánico es alto, puesto que las bacterias fueron sensibles a las concentraciones probadas (0.75, 1.5 y 6.0 mg/mL) durante las primeras horas de exposición (Figura 2).

Las curvas de cinética microbiana de *S. aureus* con los extractos acetato de etilo y metanólico (Figura 2b y 2c) exhibieron un efecto bacteriostático en las concentraciones evaluadas, debido a que impiden el máximo crecimiento de las poblaciones en comparación con el testigo, pues el extracto solo inhibe la reproducción y desarrollo del microorganismo (Molina, 2015), en cambio, no es capaz de destruir sus células (Bado *et al.*, 2013). En el caso particular con el extracto acetato de etilo (Figura 3b) los resultados coinciden con los obtenidos por Ribeiro de Paiva *et al.*, (2003), al reportar la inhibición del crecimiento con una CMI de 1.56 µg/mL del compuesto plumbagina, que es una naftoquinona obtenida del extracto clorofórmico de raíces de *P. scandens*. La diferencia entre la CMI probada en este trabajo y en el trabajo mencionado posiblemente se dio porque la resistencia natural bacteriana tiene la característica de ser propio a una especie en particular (Calderón y Ulate, 2016).

El extracto metanólico tuvo efecto bacteriostático sobre *S. aureus* desde la concentración de ½ CMI (1.5 mg/mL) a partir de las dos horas de exposición (Figura 2c), lo que coincide con Ibarra-Rivera *et al.*, (2018), quienes mencionan que a partir de una concentración de 1.33 mg/mL del extracto metanólico de *P. auriculata* se observó la disminución del porcentaje del crecimiento de la población de *S. aureus*, el efecto lo atribuyen a la presencia de fenoles. Cabe mencionar, que en este trabajo se obtuvo una CMI de 1.5 mg/mL, aunque esta concentración contiene diferentes metabolitos secundarios, los cuales en acción conjunta proporciona una mejor respuesta (Sepúlveda *et al.*, 2003). Otro estudio que coincide con los resultados previos es el de Ribeiro de Paiva *et al.*, (2002b) al reportar en *P. scandens* y *P. auriculata* la presencia de flavonoides, específicamente quinonas, en un extracto metanólico de tallos y hojas, a las cuales le atribuyen actividad biológica gracias a su toxicidad. De igual forma, Cortés (2005) encontró que el extracto etanólico de *P. pulchella* fue activo al disminuir el crecimiento de *S. aureus* a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0 mg/mL.

El efecto de los extractos de baja polaridad de las plantas del género *Plumbago* sobre *E. coli* no habían sido reportados, lo cual es relevante ya que esta cepa representa uno de los principales patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales infecciosas, diarrea acuosa o disentería (Hernández *et al.*, 2011), también es el agente más frecuente en infecciones urinarias (Torres y Mattera, 2010). Lo anterior coincide con los padecimientos por los cuales las personas utilizan a *P. pulchella* para aliviarlos, en el presente estudio se puede observar la cinética del crecimiento bacteriano (Figura 3a) encontrándose un efecto bactericida sobre dicha cepa a partir de las dos horas de exposición, esto de igual manera se podría deber a los fenoles contenidos en el extracto pues Cabrera *et al.*, (2007) mencionan que la CMI de fenoles para *E. coli* es de 2.0 mg/mL.

Respecto al extracto acetato de etilo (figura 3b) solo se presentó efecto bacteriostático a partir de las primeras dos horas en todas las concentraciones experimentales en comparación con el grupo testigo, estos resultados son diferentes a lo reportado por Ribeiro de Paiva *et al.*, (2003) quienes analizaron la actividad del compuesto plumbagina

extraída con cloroformo (media polaridad), la cual no fue efectiva sobre la cepa, sin embargo, Cortés, (2005) con un extracto etanólico, reportó que *P. pulchella* si fue efectivo reduciendo el crecimiento de la población bacteriana debido a su contenido de flavonoides y saponinas, al igual que en el presente trabajo. De igual forma los resultados de este trabajo coinciden con Ibarra-Rivera *et al.*, (2018), quienes reportaron una disminución en crecimiento bacteriano de *E. coli* con una CMI de 1.33 mg/mL con un extracto metanólico, solvente que puede atraer moléculas desde mediana a alta polaridad como miembros de los flavonoides y terpenos.

La cinética del crecimiento bacteriano de *K. pneumoniae* (Figura 4) muestra efecto bactericida del extracto metanólico sobre la cepa a partir de las 12 horas con la concentración de 9.0 mg/mL, en comparación con el resto de las concentraciones experimentales (1/2 CMI y CMI: 3.0 y 6.0 mg/mL), coincidiendo con Ibarra-Rivera *et al.*, (2018), quienes reportan una disminución del crecimiento bacteriano a partir de 1.3 mg/mL del extracto metanólico de *P. auriculata*, al igual Jeyachandran *et al.*, (2009) concluyeron la inhibición del crecimiento de *K. pneumoniae* con una CMI de 14µg/disco con un extracto metanólico, la importancia de esta bacteria recae, además de ser una especie de importancia clínica, es la más estudiada dentro del género *Klebsiella*, ya que ha ganado resistencia a los antibióticos en los últimos años y causa infección del tracto urinario y neumonía (López y Echeverri, 2010), además de ser una bacteria Gram negativa que al tener una bicapa de lipopolisacáridos con porinas que forman poros hidrófilos en los que difunden de manera pasiva pequeñas moléculas hidrofílicas (600Da) pero impide el paso de otras moléculas de mayor tamaño (>1000 Da), en comparación con las Gram positivas, que al no tener membrana externa el límite de exclusión es de (1000 kDa) (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Por consiguiente, el que el extracto de *P. pulchella* haya podido inhibir por completo su crecimiento bacteriano es relevante, destacando que el presente trabajo es el primero de *P. pulchella* en el que se reporta el efecto de alguno de sus extractos sobre dicha cepa.

Los extractos hexánico y acetato de etilo mostraron actividad antifúngica al inhibir el crecimiento de las cepas del género *Candida* (Cuadro 6), lo que sugiere que estos

extractos tienen potencial antifúngico y que pueden emplearse como remedios alternativos en las infecciones causadas por este género de levaduras, de las cuales *C. albicans* es el principal precursor de candidiasis de la mucosa del tracto gastrointestinal y vaginal, y es el agente aislado con mayor frecuencia en candidemias en el mundo (Biasoli, 2013). Este resultado coincide con el de Ribeiro de Paiva *et al.*, (2003) quienes reportan la inhibición de *C. albicans* por medio de un extracto clorofórmico a una concentración de 0.78 µg/mL, el cual es un solvente de polaridad baja a media, como a los que fue susceptible la cepa probada (Figuras 5). Además, en la mayoría de los trabajos donde se reporta la actividad antifúngica sobre cepas de *Candida*, la acción inhibitoria es por parte de aceites esenciales, en los cuales la actividad antimicrobiana que ejercen se debe especialmente mono y sesquiterpenos (Vera *et al.*, 2007), los cuales son metabolitos de baja y mediana polaridad. Al ser este tipo de sustancias coincide con la forma de consumir por las comunidades ya que se consumen en forma de infusión, de acuerdo con datos etnobotánicos de la especie.

Los resultados de la actividad sobre hongos miceliados constituyen el primer registro de la especie de estudio sobre este tipo de microorganismos, los cuales son agentes patógenos considerados oportunistas y resistentes a antimicrobianos comerciales (Montes-Belmont *et al.*, 2000) (Cuadro 7). En esta evaluación se encontró que la concentración fungicida media del extracto metanólico sobre *A. niger* es de 0.82 mg/mL (Figura 6). Esta cepa, al igual que otras especies del género *Aspergillus*, provoca aspergilosis, que es una infección local o enfermedad alérgica, que puede llegar a ser muy peligrosa para el ser humano, ya que el género tiene un mecanismo de acción mediante intoxicación por micotóxicos a los cuales se les ha demostrado potencial hepatotóxico y cancerígeno (Méndez, 2015) como las aflatoxinas, producidas notablemente por *A. niger* (Bolet y Socarrás, 2005).

En la composición fitoquímica (Cuadro 8) los fenoles fueron el grupo de metabolitos secundarios que tuvieron un viraje de color evidente en la prueba colorida de los tres extractos, estos compuestos son bacteriostáticos y su sitio blanco es la membrana interna citoplasmática afectado su integridad comprometiendo a los fosfolípidos (Cabrera *et al.*,

2007). Los fenoles proporcionan una respuesta antimicrobiana, la literatura reporta la presencia de flavonoides en otras especies del género *Plumbago*, siendo el compuesto más importante y más reportado la naftoquinona plumbagina, la cual es el resultado del fenol y la responsable de la actividad antimicrobiana en extractos de polaridad media a alta, como el extracto clorofórmico de *P. scandens* (Ribeiro de Paiva *et al.*, 2003; Ribeiro de Paiva *et al.*, 2011), por tanto, podría ser la responsable del efecto bacteriostático del extracto acetato de etilo sobre el crecimiento bacteriano de la cepa *S. aureus* en este trabajo. El mecanismo de acción antimicrobiana de la plumbagina, como se mencionó anteriormente, degrada la pared celular lo cual modifica la permeabilidad de la pared y al ingresar al citoplasma actúa sobre las enzimas de la célula al reaccionar con los radicales, por ende, causa su inactivación y de esta manera obstaculiza su actividad enzimática (Moncada *et al.*, 2011). Otro aspecto atribuido a plumbagina es un efecto citotóxico sobre cáncer de cérvico uterino (Cortés, 2005), lo cual está relacionado con su uso común para cuidados posteriores al parto (Cuadro 1).

Ribeiro de Paiva *et al.*, (2002b) reportaron para *P. scandens* y *P. auriculata* la presencia de flavonoides mediante un análisis cromatográfico de un extracto metanólico de tallos y hojas y hallaron diferentes quinonas a las cuales se le ha atribuido actividad biológica sobre microorganismos, la cual es debida a su toxicidad, tienen la propiedad de generar especies reactivas de oxígeno, lo que altera procesos biológicos como la biosíntesis de ácidos nucleicos, peroxidación de los lípidos y desestabilización de mecanismos responsables de generar ATP, lo que altera el transporte de electrones y con ello se inhibe la respiración celular de los microorganismos (López *et al.*, 2011). También, Lappe y Ulloa, (1989) encontraron fenoles con actividad antimicrobiana en las raíces de *P. scandens*.

En el extracto metanólico se observó la presencia de saponinas, su mecanismo de acción antimicrobiana de este grupo de metabolitos se da sobre la membrana plasmática en general, por lo cual puede actuar sobre levaduras, bacterias y en hongos miceliados, es decir, su espectro de acción es amplio (Montes-Belmont *et al.*, 2000), como se observó en este trabajo, puesto que los extractos fueron activos en hongos (Figura 6; Cuadro 7).

Respecto a los alcaloides se encontraron en el extracto hexánico y acetato de etilo, los cuales suelen ser extraídos en su mayoría por solventes de carácter apolar, lo cual coincide con los resultados obtenidos (Cuadro 8), sus efectos inhibitorios están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis (Sepúlveda *et al.*, 2003).

En los extractos no se observó la presencia de taninos, lo cual difiere con lo reportado por Ribeiro de Paiva *et al.*, (2002a) quienes reportaron taninos condensados en el extracto metanólico de *P. scandens* y *P. auriculata*. En otro trabajo, la presencia de taninos fue reportada en el extracto metanólico de *P. auriculata*, además en el mismo extracto se encontraron esteroides (Ibarra-Rivera *et al.*, 2018). La variación es provocada por perfiles metabólicos diferentes entre especies, e ntre miembros de una población y entre diferentes órganos de las plantas, lo cual es parte de la estrategia de adaptación. Asimismo, es ocasionada por los cambios estructurales dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios, dadas por modificaciones químicas a la estructura básica (Sepúlveda *et al.*, 2003).

En resumen, los extractos de *P. pulchella* mostraron un amplio espectro en la actividad antimicrobiana. El extracto con mayor actividad fue el hexánico, principalmente sobre bacterias Gram positivas, no obstante, en todos los grupos de microorganismos evaluados mostró actividad antimicrobiana. Los resultados permiten avalar el uso medicinal de *P. pulchella* en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

CONCLUSIONES

- *Plumbago pulchella* posee actividad antimicrobiana.
- El extracto con mayor rendimiento fue el metanólico.
- Los tres extractos de *P. pulchella* mostraron efecto inhibitorio sobre todos los grupos de microorganismos evaluados (bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos levaduriformes y miceliados), excepto el extracto metanólico que no mostró inhibición sobre hongos levaduriformes.
- El extracto hexánico presentó mayor actividad antimicrobiana al mostrar el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento de los microorganismos.
- El extracto hexánico mostró efecto bactericida en las curvas de supervivencia microbiana de *S. aureus* y *E. coli*.
- Los resultados permiten demostrar que *P. pulchella* tiene efecto antimicrobiano en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

ÁPENDICES

Apéndice 1.

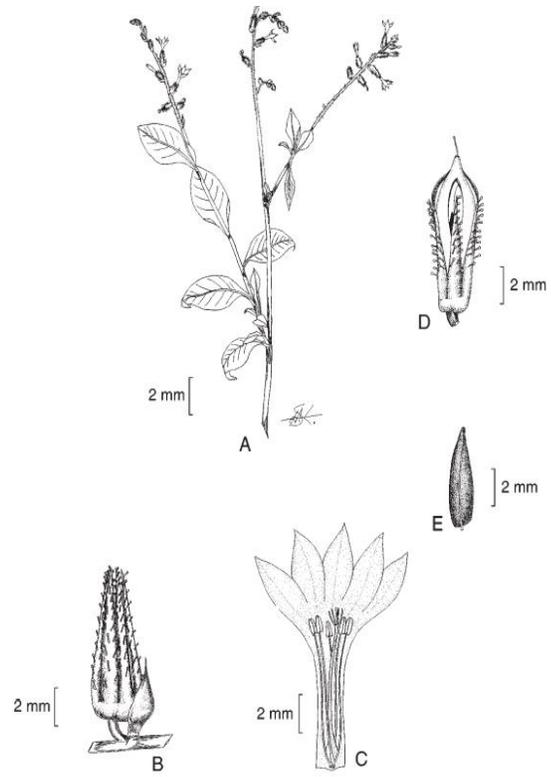
Plumbago pulchella Boiss (Calderón de Rzedowski, 1996; Zumaya-Mendoza, 2011).

Plumbago pulchella es una planta herbácea perenne, en ocasiones sarmentosa, regularmente de 50 a un metro de largo, glabra pero pegajosa por la presencia de glándulas mucilaginosas pediceladas hacia la inflorescencia; hojas con pecíolo no muy bien definido, hasta un metro de largo, de lámina ovoide, de 3 a 11 cm de largo y 1 a 4 o 5 cm de ancho, ápice agudo y de borde entero; inflorescencias terminales dispuestas en formas de racimos espiciformes de 10 a 20 cm de largo, pedúnculos y ejes de los racimos provistos de glándulas de glándulas estipitadas, una bráctea de 2-0-3.5cm largo ovado-lanceolada con margen ciliado y glandular, flores muy cortamente pediceladas y previstas de una bráctea basal ampliamente ovada, de 2 a 3.5 cm de largo; cáliz de 5 a 7 mm de largo anguloso, inicialmente tubuloso hasta su ápice y provisto de 5 dientes triangulares; corola hipocraterimorfa, azul-morada de 12 a 15 mm de longitud, tubo largo y estrecho, lóbulos oblongos a lanceolados 3 a 4 mm de largo agudos en el ápice; estambres con filamentos delgados alrededor de 7.0 a 8.0 mm de largo, anteras de 1.0 a 1.2 mm largo linear-oblongas, azules y glabras; ovarios 2.0 a 3.0 mm de largo, 1.0 a 2-0 mm de ancho piriforme, ápice agudo-glabro, 5 estigmas cilíndricos alargados, fruto envuelto en cáliz de 6 a 9 mm de largo cilíndrico-claviforme; cápsula de 4 a 8 mm de largo y 1.4 a 2 mm de ancho, oblongas, picudas en el ápice, pardo-amarillentas y glabras; semilla fusiforme de 4 a 5.5 mm de largo, 0.5 a 1.5 mm de ancho, negra y glabra.

Es una planta endémica de México de amplia distribución, abarca los estados de Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Veracruz y Zacatecas y CDMX. Habita en matorral xerófilo, bosque tropical caducifolio, bosque de galería y Quercus, sobre suelo calizo, somero arenoso negro, ígneo, en elevaciones de 1040 a 2320 msnm. Florece en febrero a diciembre y fructifica en febrero.



a)



b)

Figura 7. Morfología de *Plumbago pulchella*

a): *Plumbago pulchella*; **b):** A) rama con flores y frutos, B) cáliz, C) corola disecada mostrando androceo y gineceo, D) fruto, E) semilla. (Imágenes tomadas de **a)** Lazcano, 2019; **b)** Calderón de Rzedowski, 1996).

Apéndice 2.

COLECTA

El material vegetal se colectó en la comunidad de Santiago Quiotepec, en el municipio de San Juan Bautista Cuicatlán, se ubica al noroeste de la ciudad de Oaxaca y se encuentra a 560 msnm. Tiene climas cálido semiseco y cálido semitropical en la región de la Cañada Cuicateca, con lluvias moderadas a escasas en el verano (Martínez, 2012), la temperatura promedio de la región varía entre los 16 y 30 °C. En verano alcanza temperaturas hasta de 36 °C, tiene un promedio anual de precipitación pluvial de 500 mm. Dentro de su vegetación se encuentran higo, guapinol, aguacatillo, roble y cedro en las partes altas; en las bajas se encuentra principalmente la fauna semidesértica (INAFED, 2010). Esta comunidad se encuentra dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, la cual es un Área Natural Protegida (ANP) con una superficie de 490,186-87-54.7 hectáreas, comprende parte del sureste del estado de Puebla y noroeste del estado de Oaxaca (SEMARNAT y CONANP, 2013).

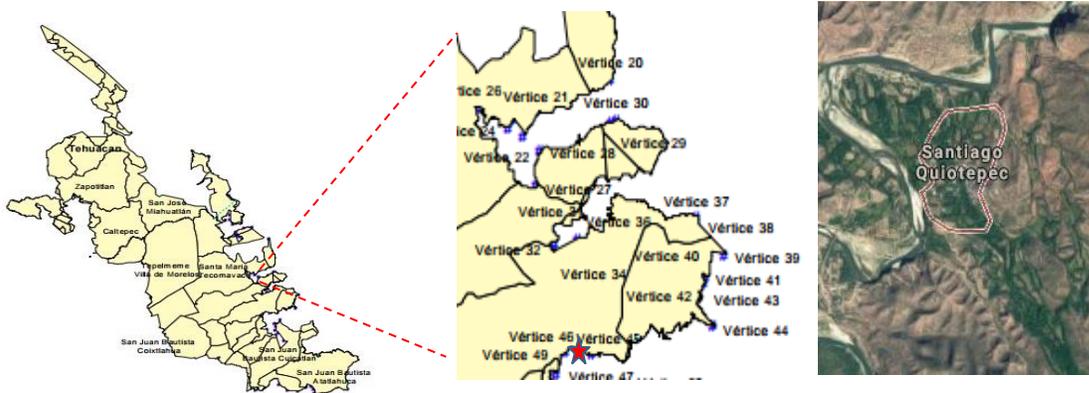


Figura 8. Ubicación de Santiago Quiotepec, Cuicatlán en la Reserva de la Biosfera Tehuacán Cuicatlán (Imagen tomada de Pizaña, 2009).

★: Santiago Quiotepec.

Apéndice 3.

MÉTODO DE MACERACIÓN (Domínguez, 1973).

La planta seca se tritura y se pesa para posteriormente ser colocada en un matraz Erlenmeyer, al cual se le agrega el solvente deseado (hexano, acetato de etilo o metanol) hasta que cubra a la planta y el matraz se tapa con papel aluminio. Se deja reposar durante 24 horas, el extracto se filtra y el solvente en el que está disuelto el extracto se separa por destilación a presión reducida en un rotavapor. El extracto libre de solvente se colecta en un frasco previamente pesado para después calcular el rendimiento de cada extracto.

Apéndice 4.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE KIRBY-BAUER (Koneman *et al.*, 1991).

Para los bioensayos bacterianos se utiliza como medio de cultivo el agar Müller-Hinton y para los bioensayos antifúngicos (hongos levaduriformes) se usa PDA, el medio debe alcanzar un espesor de 4mm para que no se difundan en más de una dirección lateral la sustancia a evaluar aumentando las zonas de inhibición, si es menor a 4 mm o más grueso no se produce mayor difusión del antibiótico hacia abajo provocando que se estreche artificialmente las zonas de inhibición. El inóculo se prepara con un asa de siembra para tocar 4 o 5 superficies convexas de las colonias, posteriormente el asa de siembra se sumerge y enjuaga en 10 mL del caldo Müller-Hinton, para descargar todo el material. Se incuba a 37 °C por 24 horas o hasta que la turbidez represente una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL, lo cual equivale al estándar No. 0.5 de McFarland. Después se sumerge un hisopo estéril y seco en el tubo con la suspensión bacteriana y se retira, siempre y cuando se retire el exceso de líquido rotándolo en la pared interna del tubo. Con el hisopo se inocula la superficie de una placa con agar solidificado y se siembra mediante estría en tres direcciones, girando la placa en ángulos de 60° luego de cada estría. Se deja secar el inóculo.

Posteriormente se utilizan discos de 5mm de diámetro de papel filtro impregnado con 2mg de los extractos a evaluar y 10 µL del solvente utilizado, estos se colocan manualmente con una pinza estéril en la superficie del agar, cada sensidisco se coloca

22 mm separado uno del otro y a 14mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la caja. Como control negativo se ocupa 10 μ L/disco del solvente empleado para la obtención de los extractos y como control positivo se usa 25 μ g/disco de cloranfenicol.

Una vez preparadas las cajas, se colocan en una incubadora 36 °C sin tensión de CO₂, se debe evitar presión de CO₂ para evitar la formación de ácido carbónico en la zona humedecida, provocando el descenso de pH, ya que un descenso de pH puede provocar el desarrollo de algunos microorganismos, lo cual estrecha falsamente la zonas de inhibición, además que valor de pH puede ser cambiado por lo antibióticos produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Para determinar si el extracto es activo se toma en cuenta que existan zonas de inhibición, las cuales se miden con una regla calibrada en mm.

Los sensidiscos se deben preparar con 24 horas de anticipación, cada bioensayo se hace por triplicado y se reportaran los valores promedios y sus desviaciones estándar.

Apéndice 5.

MICROTÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO (Koneman *et al.*, 1996).

En esta técnica la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos se determina en placas de 96 pozos con tapa. El método se utiliza para determinar las concentraciones que inhiben el crecimiento de los microorganismos.

Se prepara una suspensión bacteriana, para ello se inocula una asada de la colonia de estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton y se incuba a 37 °C durante 24 horas para obtener una concentración bacteriana de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL. El inóculo se diluye en caldo Müller-Hinton hasta obtener una concentración de 1.5×10^5 UFC/mL, para lo cual se adicionan 10 µL del inóculo original en 10 mL de caldo.

La microplaca se prepara al colocar por triplicado 50 mL de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de extracto a evaluar. Las concentraciones empleadas en este trabajo fueron: 0.25 a 3.0 mg/mL y un testigo sin extracto. A continuación, se adicionan en cada pozo 50 µL de la suspensión microbiana diluida (1.5×10^5 UFC/mL). El caldo de cultivo para todos los experimentos se preparó con 1% de tween 80, con el propósito de mejorar la solubilidad de los extractos.

La placa se cubre con su tapa para evitar el desecamiento durante la incubación, la cual se lleva a cabo a 37 °C durante 24 h.

Como control negativo se utiliza el solvente empleado para disolver el extracto y como control positivo se emplean pozos con 30 µg/mL de cloranfenicol.

Después del tiempo de incubación se añaden en cada pozo 50 µL de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08%. La placa se incuba durante 30 min y se leen los resultados.

En los pozos donde aun hay desarrollo de los microorganismos el colorante es reducido a formazán y es evidente por la formación de un botón rojo en el fondo del pozo. Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara y tales pozos corresponden con la CBM.

Apéndice 6.

ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CURVA DE SUPERVIVENCIA BACTERIANA (Muroi *et al.*, 1993)

Este método se usa para determinar los impactos necesarios para que se produzca la muerte bacteriana mediante el efecto que tiene el extracto en el crecimiento bacteriano basándose en las CMI y CBM obtenida. Se usa como medio de cultivo el agar Müller-Hinton con un espesor de 4mm, este se vacía en cajas Petri septadas.

El inóculo se prepara en un tubo de ensayo con 10 mL de agar Müller-Hinton con aproximadamente 1×10^5 UFC/mL (se dejan incubar aproximadamente 24 hora para obtener la concentración anterior). Con una micropipeta se inocula 0.1 mL de la suspensión bacteriana en tubos con los extractos, resultando una concentración final de aproximadamente de 1×10^5 UFC/mL. Se incuba en una estufa a 35°C sin presión de CO₂. Los extractos se preparan en tubos con 10 mL de caldo Müller Hinton con las concentraciones a evaluar. A los tubos experimentales se les agrego Tween al 1 % para mejorar la solubilidad de los extractos.

Se muestrea cada dos horas durante los primeros cinco tiempos: T0-0, T1-2, T2-4, T3-6, T4-8 (tiempo-horas transcurridas), luego un muestreo a las 12 horas (T5-12) y finalmente uno a las 24 horas (T6-24). En cada tiempo se realiza dos diluciones de 50 µL en tubos con 5 mL de solución salina para determinar las UFC en cada tubo. Se usa como testigo un tubo sin extracto.

Finalmente se incuban las cajas a 37 °C por 24 horas. Para interpretar los resultados se cuentan las colonias de cada concentración y dilución, se grafica el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo, para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación bacteriana, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

Apéndice 7.

7a. MÉTODO CUALITATIVO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL (Wang y Bun, 2002).

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antifúngica de los extractos sobre hongos miceliados, el método funciona porque los compuestos difunden a través del agar provocando la deformación de la colonia, si el extracto es activo.

Se usan cajas Petri con 20 mL de agar PDA en el cual se inocula un botón de 1mm de micelio del hongo en el centro de la caja, después se colocan alrededor del botón de micelio sensidiscos de 5 mm de diámetro previamente impregnados con 2 mg del extracto a una distancia de 2 cm del límite micelial. Posteriormente se incuban las cajas a 28 °C durante 72 a 96 horas. Como control positivo se ocupan sensidiscos impregnados con 60 µg/disco de Ketoconazol y como control negativo sensidiscos con 10 µL/disco de los solventes. Todos los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo para que el disolvente se evapore por completo. El bioensayo se realiza por triplicado y los resultados se interpreta como extracto activo es en el que si se presentan zonas de inhibición y/o deformación de la colonia.

7b. MÉTODO CUANTITATIVO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL (MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR) (Wang y Bun, 2002).

Se utilizan cajas de cultivo con 24 pozos los cuales tendrán 1.5 mL de agar PDA y diferentes concentraciones de los extractos (0.125 a 3.0 mg/mL). Después se coloca un 1 mm de diámetro del micelio del hongo en el centro de los pozos. Como control negativo se usan placas con el mayor volumen de los solventes utilizados para la maceración y como grupo testigo se usan placas sin extractos para comparar la velocidad de crecimiento. Posteriormente las cajas son incubadas de 24 a 72 horas a 28 °C (o hasta que haya crecido el micelio). Todos los bioensayos se realizan por triplicado. Para interpretar los resultados se mide el crecimiento del hongo y se realiza una gráfica concentración-respuesta, en la que la respuesta es el porcentaje de inhibición, tomando en cuenta que el grupo testigo es el 0% de inhibición; se reporta en porcentaje de inhibición la CFM, la cual representa el 100% de inhibición del hongo y la CF₅₀ representa el 50% inhibición. Lo anterior se realiza con un modelo matemático.

Apéndice 8.

DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS (Domínguez, 1979).

Para cada diferente grupo de metabolitos secundario se utilizó un reactivo en específico, el cual se agregó a un tubo de ensayo con el extracto a analizar, posteriormente el tubo se leyó como positivo según su aspecto (Cuadro 9).

Cuadro 9. Reactivos y aspecto para determinar grupo de metabolito secundario.

Grupo de metabolito secundario	Reactivo	Aspecto
Fenoles	Cloruro férrico	Coloración azul/verde
Alcaloides	Mayer	Mayer: Precipitado lechoso
	Dragendorff	Dragendorff: Precipitado color ladrillo
Terpenos	Vainillina y H ₂ SO ₄	Halo azul verdoso, morado o naranja rojizo
Saponinas	Agua destilada	Espuma constante por un minuto
Glucósidos	A-naftol y HCl	Anillo morado
Cumarinas	NaOH y HCL	Transparente al virar desde amarillo al agregar 3 gotas de HCL al 10%
Triterpenos y esteroides	Liebermann-Buchard	Color azul/verde para esteroides y color rojo/violeta para triterpenos
Flavonoides	Hidróxido de sodio	Color amarillo intenso
Taninos	Gelatina 1%	Taninos hidrolizados: precipitado azul/negro y taninos condensados: verde pardo

BIBLIOGRAFÍA

- 3 Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammad, F. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal Ethnopharmacol*, 62: 183-193.
- 3 Alemán, Z. F., Quezada, B. J. B., Garmendia, Z. M. 2012. *Flora Arvense y Ruderal del Pacífico y Centro de Nicaragua Volumen 1*. Nicaragua. 272 pp.
- 3 Arriaga, L., J.M. Espinoza, C. Aguilar, E. Martínez, L. Gómez y E. Loa. 2000. *Regiones terrestres prioritarias de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- 3 Ávalos, G. A. y Pérez- Urría, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3): 119-145.
- 3 Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228: 1154-1160.
- 3 Barquero, A.A. 2007. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Química Viva*, 6(2): 19-35.
- 3 Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). 2009. Pañate, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomado el 09 de agosto de 2017. Disponible en: <https://cutt.ly/ohSFmN>
- 3 Bado, I., Garcia, V., Robino, L., Cordeiro, N., Seija, N., Vignoli, R. 2013. Principales mecanismos de resistencia microbiana. Instituto de higiene, Universidad de la Republica. Disponible en: <https://cutt.ly/ThSF4A>
- 3 Biasoli. 2013. Candidiasis. Centro de Referencia de Micología. Disponible en: <https://cutt.ly/2hSDU9>
- 3 Bolet, A. M. y Socarrás, S. M. M. 2005. Micotóxicas y cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 24(1): 54-9.
- 3 Calvo, J., Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 27(1): 44-52.

- 3 Cabrera, C. E., Gomez, R. F., Zuñiga, A. E. 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.
- 3 Calderón, R. G., Ulate, L. A. 2016. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista medica de Costa Rica y Centroamérica*, 73(621): 757-763.
- 3 Calderón de Rzedowski, G. 1996. Plumbaginaceae. En: Rzedowski, J; Calderón de Rzedowski, G. (Eds.), *Flora del bajío y regiones adyacente*. Fascículo 44. Instituto Nacional de Ecología.
- 3 Canales, M. N., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo, de Vivar R. A., Duran, D. A., Lira, S. R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*, 75: 21-43.
- 3 Chifa, C. 2010. La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(4): 242-245.
- 3 Cortés, C. J. 2005. *Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo* (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Pachuca de Soto, Hidalgo.
- 3 Cuadros, M. A. 2010. *Evaluación antibacteriana de metabolitos secundarios de extractos de cepas híbridas de Pleurotus spp* (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Mexico.
- 3 Devesa, J. A., Castroviejo, S. 2019. Plumbaginaceae. Flora vascular. Disponible en: <https://cutt.ly/x99TDA>
- 3 Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Mexico: Editorial Limusa. 281 pp.

- 3 Evangelista-Martínez, Z. y Moreno-Enríquez, A. 2007. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *BioTecnología*, 11(3): 37-50.
- 3 Fagetti, A. 2019. Fundamentos de la medicina tradicional mexicana. En: Argueta, V. A., Corona-M, E., Hersch, M. P. (Ed.), *Saberes colectivos y diálogos de saberes en México* (137-151 pp), 1era edición. Cuernavaca, México. CRIM-UNAM, Centro INAH-Morelos.
- 3 Fernández, L. R. 2015. *Metabolitos secundarios de plantas superiores y análogos con actividad biológica* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- 3 González-Stuart, A. y Rivera, O. J. 2009. Comparison of herbal products use in two largest border communities between the US and Mexico. *Herbalgram*, 81: 58-66.
- 3 Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1-93.
- 3 Hernández, C. C., Aguilera, A. Ma. G., Castro, E. G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4): 137-151.
- 3 Ibarra-Rivera, G., Gutiérrez, L. M., Robles, G. M. A. 2018. Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *Plumbago auriculata* LAM. *Biotecnia*, 20(1): 53-60.
- 3 Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). 2010. Enciclopedias de los municipios y delegaciones de México, Estado de Oaxaca, San Juan Bautista Cuicatlán. Tomado el 23 de agosto de 201. Disponible en: <https://cutt.ly/8hSXYJ>
- 3 Jeyachandran, R., Mahesh, A., Cindrella, L., Sudhakar, S., Pazhanichamy, K. 2009. Antibacterial activity of plumbagin and root extracts of *Plumbago zeylanica* L. *Acta Biológica Cracoviensia*, 51(1): 17-22.

- 3 Jiménez, S. A. A. 2017. Medicina tradicional. Boletín CONAMED-OPS.
- 3 Juárez-Rosete, C.R., Aguilar-Castillo, J.A., Juárez-Rosete, M.E., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P., Cruz-Crespo, E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e Innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3): 119-129.
- 3 Koneman, E. W. 1991. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 393 pp.
- 3 Koneman, E., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. 1996. *Diagnóstico microbiológico*. Argentina: Editorial Médica Panamericana. 909 pp.
- 3 Koolman, J. y Klaus-Heinrich, R. 2005. *Bioquímica: texto y atlas*. Argentina: Editorial Médica Panamericana. 488 pp.
- 3 Lagarriga, A. S. 2000. Medicina tradicional en México: conceptos, actitudes y valores de sus seguidores. En: Villalba, C. J. (comp.), *Medicina tradicional en México* (17-49 pp). México. INER.
- 3 Lappe, P. y Ulloa, M. 1989. *Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesgüino tarahumara*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. 123 pp.
- 3 Lazcano G. E. 2019. Chilillo Medicinal (*Plumbago pulchella*). [Figura]. Naturalista, CONABIO. Disponible en: <https://cutt.ly/qXNcR5>
- 3 Lezama, T. P. 2000. *Plumbago pulchella* Boiss. [Figura]. Disponible en: <https://cutt.ly/bhSX6f>
- 3 Lizcano, R. A. J. y Vergara, G. L. J. 2008. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos* (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Bogotá D.C., Colombia.

- 3 López, L. L. I., Leyva, E. García, C. F. R. 2011. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(1): 06-17.
- 3 López, V. J. A. y Echeverri, T. L. M. 2010. *K. pneumoniae*: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Iatreia*, 23(2): 157-165.
- 3 Magaña, A. M. A., Gama, C. L. M., Mariaca, M. R. 2010. El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*, (20): 213-262.
- 3 Martínez, R. 2012. Quiotepec, florece la roseta y turismo verde. Grupo NVI noticias. Tomado el 23 de agosto de 2017. Disponible en: <https://cutt.ly/nhSBA7>
- 3 Méndez, T. L. J. 2015. Aspergilosis. Departamento de Microbiología y Parasitología (UNAM)-Recursos en Bacteriología. Disponible en: <https://cutt.ly/hhSCxy>
- 3 Molina, L. J. 2015. Drogas antibacterianas. Departamento de Microbiología y Parasitología (UNAM)-Recursos en Bacteriología. Disponible en: <https://cutt.ly/rhSCnK>
- 3 Moncada, A N., Farcio, V. M., Rojas, I. C., Trevisan, F. D., Horna, D. O., Perreira, J. Delgado, P. G. E. 2011. Actividad biológica de *Plumbago scandens* L. sobre cepas multidrogoresistente de *Mycobacterium tuberculosis*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3): 233-245.
- 3 Montes-Belmont, R., Cruz, C. V., Martínez, M. G., Sandoval, G. G., García, L. Rogelio., Zilch, D. S., Bravo, Leticia., Bermúdez, T. K., Flores, M., Hilda, E., Carvajal, M. Magda. 2000. Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivo de Investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18 (1):125-131.
- 3 Muroi, H., Kubo, A., Kubo, I. 1993. Antimicrobial activity of cashew apple flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(7): 1106–1109.

- 3 Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Medicina tradicional. Informe de la secretaría 56ª asamblea mundial de la salud. Disponible en: <https://cutt.ly/lhSCUU>
- 3 Organización Mundial de la Salud (OMS). 2019. Medicina tradicional: definiciones. Disponible en: <https://cutt.ly/bhSCFZ>
- 3 Osuna, T. L., Tapia, P. M. E., Aguilar, C. A. 2005. *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Barcelona, España: Universitat de Barcelona. 173 pp.
- 3 Pérez-Alonso, N., Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4): 195–211.
- 3 Pizaña, S. J. C. 2009. *Programa de protección de la guacamaya verde (Ara militaris)*. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Pronatura Veracruz A.C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. DT004. México D. F. Disponible en: <https://cutt.ly/OhSVFp>
- 3 Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J. A., Molina-Torres, J. 2004. Actualidad de la medicina herbolaria. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 35(1): 19-36.
- 3 Ravelo, G. A., Estévez, B. A. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(2): 409-419.
- 3 Robles-García, M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., Madrigal-Pulido, J. A., Del-Toro-Sánchez, C. L. 2016. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XVIII (3): 3-8.

- 3 Romero-Cerecero, O. y Tortoriello-García, J. 2007. Conocimiento sobre fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 45(5): 453-458.
- 3 Ribeiro de Paiva, S., Heringer, P. A., Figueiredo, M. R., Coelho, K. M. A. 2002a. Condensed tannins of Plumbaginaceae species. *Floresta e Ambiente*, 9(1): 153-157.
- 3 Ribeiro de Paiva, S., Fontoura, L. A., Figueiredo, R. M., Mazzei, J. L., Coelho, K. M. 2002b. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. E, *Plumbago auriculata* LAM. *Química Nova*, 25(5): 717-721.
- 3 Ribeiro de Paiva, S., Figueiredo, M. R., Aragao, V. T., Coelho, K. M. A. 2003. Antimicrobial activity *in vitro* of plumbagin isolated from *Plumbago* species *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7): 959-961.
- 3 Ribeiro de Paiva, S., Lima, L. A., Figueiredo, M. R., Kaplan, M. A. C. 2011. Fluctuaciones en la composición química de las raíces de *Plumbago scandens* L. en relación con el desarrollo floral. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83(4): 1165-1170.
- 3 Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L. P., Reyes, J., Munita, J. M., C. A. 2014. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomédica*, 34(01): 191-208.
- 3 Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y Comisión Nacional de Áreas Naturales y Protegidas (CONANP). 2013. *Programa de manejo Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán* 1era. edición.
- 3 Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., Rocha, S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de fitopatología*, 21(3): 355-363.
- 3 Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). 2004. Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Colombia. Editorial SENA. 32 pp.

- 3 Torres, M., Mattera, A. 2010. Infección urinaria. *Temas de bacteriología y virología médica*. 189-196.
- 3 Valares, M. C. 2011. *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente* (Tesis doctoral). Universidad de Extremadura. España.
- 3 Vera, J. R., Pastrana, P. F., Fernández, K., Viña, A. 2007. Actividad antimicrobiana in vitro de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. *Science et Techno*, 8(33): 345-348.
- 3 Vignoli, R. y Seija, V. 2008. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Instituto de higiene. Universidad de la República. Disponible en: <https://cutt.ly/vhSBpL>
- 3 Wang, H. y Bun, T. N. 2002. Isolation of a Thaumatin-like protein from kiwin fruits. *Phytochemistry*, (61):1-6.
- 3 Zumaya-Mendoza, S. 2011. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México. *Instituto de Biología*, 85: 1-8.