



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO
ACETÓNICO DE *Salvia mexicana*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ALMA YARELI MENDOZA CORREA

Ciudad Universitaria, CDMX. 2020





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ORTEGA MUÑOZ RAQUEL**

VOCAL: **Profesor: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA**

SECRETARIO: **Profesor: HERNÁNDEZ DELGADO CLAUDIA TZASNÁ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: FLORES MORENO KAREN**

2º SUPLENTE: **Profesor: RAMOS PEREZ DANIEL**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Bioactividad de Productos Naturales en la UBIPRO,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. Tlalnepantla de Baz. Edo. de
México.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. CLAUDIA TZASNÁ HERNÁNDEZ DELGADO

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. ROCIO SERRANO PARRALES

SUSTENTANTE:

ALMA YARELI MENDOZA CORREA

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	22
□ Objetivo general	22
□ Objetivos particulares.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Colecta del material vegetal.....	24
2. Obtención de los extractos.	24
3. Pruebas cualitativas de identificación de metabolitos secundarios.....	25
4. Cepas bacterianas y hongos.	25
5. Evaluación de la actividad antibacteriana.	27
6. Evaluación de la actividad antifúngica.....	28
7. Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento).	29
8. Pruebas estadísticas.....	29
RESULTADOS	31
1. Rendimiento de los extractos.....	31
2. Caracterización fitoquímica de los extractos.....	32
3. Actividad antimicrobiana	32
□ Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	33
□ Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.....	33
□ Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana	34
□ Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	35
4. Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento).....	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	49
APÉNDICES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Descripción de la planta <i>S. mexicana</i>	54
Apéndice 2. Extracción mediante maceración y concentración a presión reducida.....	56
Apéndice 3. Método de difusión en agar o de Kirby-Bauer.....	57
Apéndice 4. Método de microdilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM).....	59
Apéndice 5. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos.	62
Apéndice 6. Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos para la determinación de la concentración fungicida media (CF ₅₀)	64
Apéndice 7. Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento)	65
Apéndice 8. Caracterización fitoquímica de los extractos (determinación de metabolitos secundarios).....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de acción de los antibióticos	10
Tabla 2. Datos etnobotánicos de algunas especies del género <i>Salvia</i>	14
Tabla 3. Antecedentes de la actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Salvias</i>	15
Tabla 4. Antecedentes de la actividad antibacteriana de diterpenos obtenidos de <i>Salvias</i>	16
Tabla 5. Contribución fitoquímica de algunas especies del género <i>Salvia</i>	20
Tabla 6. Microorganismos a utilizar en los bioensayos	25
Tabla 7. Datos etnobotánicos de <i>S. mexicana</i>	31
Tabla 8. Rendimientos de los extractos de <i>Salvia mexicana</i>	31
Tabla 9. Composición química de los extractos de <i>S. mexicana</i>	32
Tabla 10. Prueba cualitativa de la actividad antibacteriana de <i>S. mexicana</i>	33
Tabla 11. Evaluación cualitativa de la actividad de <i>S. mexicana</i> frente al extracto acetónico, metanólico y hexánico.....	34
Tabla 12. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana del extracto acetónico de <i>S. mexicana</i> . Valores de CMI y CBM (mg/mL).....	35
Tabla 13. Concentración fungicida media (CF ₅₀) de los extractos de <i>S. mexicana</i>	39
Tabla 14. La metodología y reactivos para la detección de metabolitos secundarios:	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estados mexicanos con mayor riqueza de Salvias	13
Figura 2. Inhibición del crecimiento radial del extracto acetónico de <i>S. mexicana</i> sobre la cepa <i>A. niger</i>	36
Figura 3. Inhibición del crecimiento radial del extracto acetónico de <i>S. mexicana</i> sobre la cepa <i>F. moniliforme</i>	36
Figura 4. Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento).....	37
Figura 5. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de <i>S. mexicana</i> sobre la cepa <i>A. niger</i>	38
Figura 6. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de <i>S. mexicana</i> sobre la cepa <i>F. moniliforme</i>	38
Figura 7. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de <i>S. mexicana</i> sobre la cepa <i>T. mentagrophytes</i>	39
Figura 8. Efecto del extracto acetónico sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> ATCC 39540.....	40
Figura 9. Efecto del extracto acetónico sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> silvestre,.....	41
Figura 10. Individuo adulto de <i>S. mexicana</i>	54
Figura 11. Acercamiento de la flor de <i>S. mexicana</i>	55
Figura 12. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer.....	57
Figura 13. Sal de tetrazolio reducida a Formazán.....	61

RESUMEN

El uso inadecuado de los antimicrobianos ha provocado que los microorganismos se vuelvan resistentes. Debido a las circunstancias en las que vivimos, se han buscado diversas alternativas para solucionar esta problemática, una de ellas es la herbolaria mexicana, la cual utiliza compuestos derivados de las plantas como un remedio efectivo contra diversas enfermedades. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de *Salvia mexicana*; la cual fue colectada de la reserva natural Sierra de los Agustinos en el municipio de Acámbaro Guanajuato. La especie fue identificada en el herbario IZTA de la FES Iztacala. Se realizó la obtención de los extractos de la parte aérea de la planta seca y fragmentada mediante la técnica de maceración y concentración a presión reducida y se determinó su rendimiento en relación al peso de la planta seca el cual fue de 2.5% para el acetónico 3% para el metanólico y 0.2% para el hexánico, lo que indica que la planta contiene más compuestos polares. Se evaluó la actividad antimicrobiana cuali y cuantitativamente de los 3 extractos frente a 27 microorganismos (9 bacterias Gram-positivas, 11 Gram-negativas, 3 levaduras y 4 hongos filamentosos) mediante los métodos de difusión en agar Kirby-Bauer para bacterias, e inhibición del crecimiento radial para hongos. El único extracto con actividad en bacterias fue el acetónico, presentando inhibición en *V. cholerae* ATCC 39540 y silvestre, *S. enterica* ATCC 7251, *S. aureus* ATCC 23MR y *S. aureus* FES-C presentando mayor halo de inhibición con *V. cholerae* ATCC 39540 (8.00 ± 1.00 mm). Para los hongos, los extractos metanólico y acetónico fueron los que tuvieron efecto en las 4 cepas (*A. niger*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichum* y *T. mentagrophytes*). Para la determinación cuantitativa se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) utilizando el método modificado de microdilución en caldo. Para la cepa *V. cholerae* ATCC 39540 y silvestre la CMI fue de 0.75 mg/mL y la CBM de 3.0 mg/mL, para la cepa *S. enterica* ATCC 7251, la CMI fue de 3.0 mg/mL y la CBM fue mayor a 3.0 mg/mL y para *S. aureus* ATCC 3MR y *S. aureus* FES-C la CMI y la CBM fueron mayor a 3.0 mg/mL. Los hongos se evaluaron mediante el método de inhibición del crecimiento radial determinando la concentración fungicida media (CF₅₀); obteniendo que el mejor resultado fue el del extracto acetónico frente a *T. mentagrophytes* con una CF₅₀ de 2.23 mg/mL y una inhibición total de hasta 92.9%. Se realizó una curva letal para evaluar el efecto del extracto acetónico sobre el crecimiento de *V. cholerae* (ATCC 39540 y silvestre), obteniendo que el extracto acetónico se comporta como bactericida desde las primeras 2 horas del tratamiento con una CBM de 3 mg/mL. De manera cualitativa se

determinaron los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos, destacando que los extractos metanólico y acetónico presentan fenoles taninos, flavonoides y terpenos y el hexánico solo terpenos. Por último, se realizó un análisis estadístico (ANOVA de un factor) para comparar las diferencias significativas del extracto acetónico frente al control, obteniendo que son estadísticamente significativas. Finalmente se concluyó que el extracto acetónico de *S. mexicana* tiene efecto antimicrobiano.

INTRODUCCIÓN

El mundo está lleno de individuos que día a día tienen una lucha constante e interminable entre ellos mismos por un objetivo en común: subsistir. Si bien lo decía Darwin, la supervivencia del más apto, es una pieza clave para comprender a la naturaleza que nos rodea, no obstante, todos los seres vivos desarrollan mecanismos de defensa (algunos más especializados) para ser más competitivos. Las plantas son un claro ejemplo, ya que están expuestas a innumerables interacciones con su entorno. Se sabe que algunas de estas interacciones pueden ser perjudiciales, debido a esto, la naturaleza ha creado mecanismos de defensa o protección para asegurar su supervivencia y reproducción. Algunos de los mecanismos que utilizan las plantas contra depredadores, bacterias u hongos son los metabolitos secundarios; moléculas que presentan diversas funciones principalmente adaptativas y de reproducción, se sintetizan en pequeñas cantidades y tienen la característica particular de que se acumulan en diversas partes de la planta dependiendo su función, pudiendo estar en el tronco, corteza, hojas o flor. Estos metabolitos tienen gran relevancia médica ya que presentan diversas e innumerables actividades farmacológicas dentro de las cuales se encuentra la antimicrobiana (Díaz, 2017).

Los antimicrobianos son sustancias químicas naturales o sintéticas que inhiben el crecimiento de diversos microorganismos dentro de los cuales se encuentran las bacterias y hongos; son utilizados para desinfección, asepsias, así como para el control total o parcial de la proliferación. Estos biocidas ejercen su potencial por varios tipos de mecanismos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones del microorganismo. Gracias a estos conocimientos podemos elegir el antimicrobiano más idóneo frente a cualquier padecimiento (González, 2018).

En la siguiente tabla se describen los mecanismos de acción de los diferentes antibióticos hoy en día:

Tabla 1. Mecanismos de acción de los antibióticos. (Tomado de González, 2018)

Mecanismos de acción	Clasificación	Descripción
Inhibición de la síntesis de la pared celular	β -lactámicos	Interfieren en la síntesis de peptidoglicanos, lo que provoca una lisis bacteriana.
Alteración sobre la membrana celular	Polimixinas Lipopéptidos	Dañan la integridad de la membrana, provocando el escape de iones y macromoléculas.
Inhibición de síntesis proteica en diversos niveles del ribosoma	Aminoglucósidos Ácido fusídico	Altera la síntesis de proteínas en los procesos de: iniciación, elongación, transferencia o translocación o terminación.
Bloqueo de la síntesis y/o metabolismo de los ácidos nucleicos	Quinolonas Rifamicinas	Interfieren en la replicación del DNA, impiden la transcripción o inhiben la síntesis de metabolitos esenciales.

La curiosidad del hombre por entender el sentido de la vida lo ha llevado a comprender que la naturaleza dio todos los recursos necesarios para vivir y subsistir, algunos de estos recursos necesitan ser descubiertos o transformados para poderlos utilizar a nuestro favor. Se sabe que el 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados. Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos (Rivas C. et. al., 2016).

En el presente trabajo, se presentan los resultados de una contribución al estudio de *S. mexicana*, especie que se eligió debido a los antecedentes curativos que presenta el género *Salvia* y por la poca información que existe de la especie.

ANTECEDENTES

Desde la antigüedad el hombre primitivo adquirió información sobre las propiedades medicinales de un gran número de plantas propias de su medio ambiente, conocimiento que fue transmitido de generación en generación al principio verbalmente y después de forma escrita, como en los papiros, pergaminos, tratados de plantas etc. (Aguilera, 1994).

Las culturas indígenas de México han preservado y difundido formas y procedimientos eficaces para resolver importantes problemas de salud de la población. Las plantas han sido el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana.

Hoy en día las plantas también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna, entre otras son fuente directa de agentes terapéuticos o se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos (Aguilera, 2016).

Las plantas medicinales han suscitado el interés científico debido al hallazgo de nuevas moléculas y principios activos que dan respuestas a problemas serios de salud.

El 45% de la población nacional sigue usando la medicina tradicional como único tratamiento, sin embargo, en México la validación química y farmacológica solo se ha llevado a cabo en un 5% de las especies (Aguilera, 2016).

La OMS ha estimado que el 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria y que cada vez son más los países que reconocen su importancia dentro de la salud, por lo que se han dado a la tarea de generar un mayor acceso a la información etnobotánica así como promover la integración, reglamentación y supervisión adecuada para este campo de la medicina (OMS, 2013).

Uno de los géneros de plantas que ha llamado la atención de los científicos por sus componentes bioactivos es *Salvia*: que proviene del latín *salvaré* que significa curar. México posee una gran riqueza vegetal de este género, que pertenece a la familia Labiatae (Lamiaceae) uno de los géneros más abundantes y diversificados de esta familia, comprende aproximadamente 900 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales.

En la siguiente figura se muestran los estados con mayor riqueza de Salvias:



Figura 1. Estados mexicanos con mayor riqueza de Salvias (Jalisco, Michoacán, Guerrero, Puebla y Oaxaca).

En particular *Salvia mexicana* es una dicotiledónea de la familia Lamiaceae, planta herbácea perenne o arbusta que mide de 50 cm a 3 m de altura, sus flores son de color azul púrpura y están dispuestas en verticilos formando espigas, el número de flores en estas es muy variado. El periodo de floración se extiende de agosto a noviembre, las flores duran un periodo de 4 días. Es una planta auto compatible en la que el entrecruzamiento representa una parte importante del desempeño reproductivo. En el **apéndice 1**, se detallan más las características de esta.

El estudio de los metabolitos secundarios del género *Salvia* ha despertado marcado interés ya que algunas especies de este género se usan en la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades estomacales, circulatorias y cardiacas o por sus propiedades antitumorales, antiparasitarias, sedantes antibacterianas, antipiréticas, diuréticas y antihepatotóxicas (Aguilera, 1994).

En la siguiente tabla se enlistan algunos usos que se le atribuyen a diferentes especies de Salvias:

Tabla 2. Datos etnobotánicos de algunas especies del género *Salvia*.

Especie	Propiedades atribuidas	Referencia
<i>S. elegans</i>	Ansiolítica, antidepresiva, dolores de parto insomnio y sarampión.	Aguilar et al., 1994
<i>S. aethiopsis</i>	Para curar llagas, heridas y úlceras. El extracto de la corteza de la raíz se utilizaba para sanar hemorroides.	Medina, 1998
<i>S. ballotaeflora</i>	Tratamiento de problemas estomacales.	Medina, 1998
<i>S. divinorum</i>	Propiedades psicotrópicas, alucinógenas y eméticas.	Medina, 1998
<i>S. leucantha</i>	Tratamiento de mareos y dolores de pecho.	Medina, 1998
<i>S. microphylla</i>	Antiparasitario (tripanocida) y malestares estomacales.	Medina, 1998
<i>S. pratensis</i>	Para curar y limpiar heridas de la piel.	Medina, 1998
<i>S. verbenaca</i>	Para curar llagas, heridas y aclarar la vista.	Medina, 1998
<i>S. purpurea</i>	Baños postparto, hemorragia nasal, menstruales, disentería y diarrea	Martínez, 2010
<i>S. cardinalis</i>	Somnífero.	Islas, 2013
<i>S. fruticosa</i>	Antiséptica, antioxidante antiinflamatoria, resfriados, dolor de garganta, hipoglucemiante, dolencias cardiacas.	Islas, 2013
<i>S. hypoleuca</i>	Carminativa, antirreumática y antimicrobiano.	Islas, 2013
<i>S. lavandulifolia</i>	Para la sudoración y la menopausia, espasmolítico hipoglucemiante y anticolinesterasa.	Islas, 2013

<i>S. miltiorrhiza</i>	Tratamiento de problemas cardiacos, antioxidante y antiinflamatorio.	Islas, 2013
<i>S. mexicana</i>	Antioxidante, antiinflamatoria y ornamental.	Islas, 2013
<i>S. officinalis</i>	Cáncer de encía, antitumoral, dolores reumáticos, tratamiento de asma, normaliza las funciones menstruales de la mujer, tónico para el riñón, hígado y pulmones etc. Antiséptica, antioxidante, antiinflamatoria, antiespasmódica e hipoglucemiante.	Islas, 2013
<i>S. repens</i>	Tratamiento de diarrea y dolor de estómago, antimicrobiano y antiinflamatorio.	Islas, 2013
<i>S. sclarea</i>	Antiséptico, antiespasmódico, astringente, bálsamo estimulante en el tratamiento del cáncer, catarro, debilidad, dolor de cabeza y enfermedades digestivas, oftálmicas, de riñón y de útero.	Islas, 2013
<i>S. stenophylla</i>	Antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria.	Islas, 2013

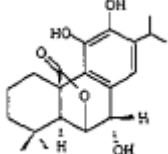
La **tabla 3** y **4** hace referencia a la actividad antimicrobiana de diversas especies de Salvias utilizando los extractos de las mismas y de manera más particular de algunos diterpenos aislados. Por último en la **tabla 5**, se hace referencia a las contribuciones científicas que se han realizado de algunas especies.

Tabla 3. Antecedentes de la actividad antimicrobiana de los extractos de Salvias.

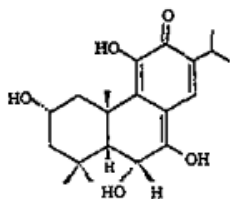
Referencia	Especie	Extracto	Actividad antimicrobiana
Mounyr et al., 2014	<i>S. officinalis</i>	Metanol	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> ATCC 25922 • <i>S. aureus</i> CIP 543154 • <i>B. subtilis</i> ILP1428B

			<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. subtilis</i> ILB142B • <i>C. albicans</i>
Bachir et al., 2015	<i>S. officinalis</i>	Acuoso	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. mycoides</i>, • <i>B. subtilis</i>, • <i>E. cloaceae</i> • <i>Proteus</i> sp
		Acuoso	<ul style="list-style-type: none"> • NA
Ghezelbash et al., 2015	<i>S. officinalis</i>	Acetona	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>S. aureus</i> • <i>B. anthracis</i> • <i>B. cereus</i>
		Etanol	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>S. aureus</i> • <i>B. anthracis</i> • <i>B. cereus</i>
Cordoba et al., 2016	<i>S. apiana</i>	Hexano	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>S. pyogenes</i> • <i>E. faecalis</i> • <i>C. albicans</i>

Tabla 4. Antecedentes de la actividad antibacteriana de diterpenos obtenidos de Salvias. (Tomado y adaptado de Medina, 1998).

Diterpenos	Especie	Actividad antibacteriana Activo
Rosmanol 	<i>S. canariensis</i>	Gram positivas - <i>S. aureus</i> - <i>B. subtilis</i>

2 α ,7-hidroxi taxodona

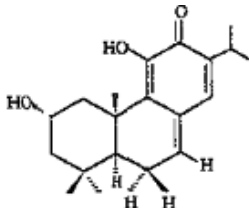


S. texana

Gram positivas

- *S. aureus*

6-deoxo-2 α -hidroxitaxodiona

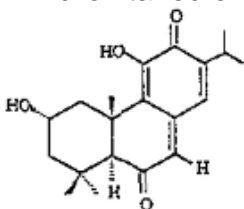


S. texana

Gram positivas

- *S. aureus*
- *B. subtilis*

2 α -hidroxitaxodiona

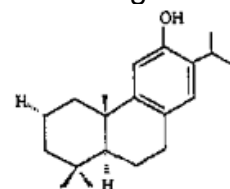


S. texana

Gram positivas

- *S. aureus*
- *B. subtilis*

Ferruginol

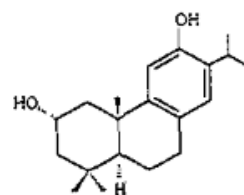


S. sclarea

Gram positivas

- *S. aureus*
- *B. subtilis*

Salviol

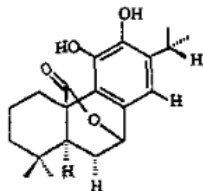


S. canariensis

Gram positivas

- *S. aureus*
- *B. subtilis*

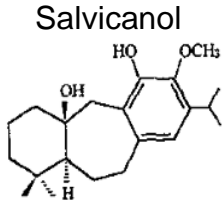
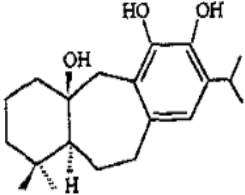
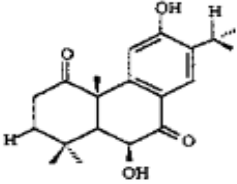
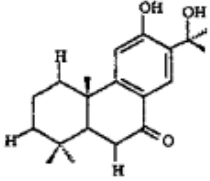
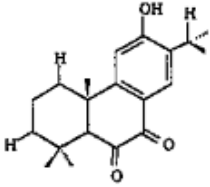
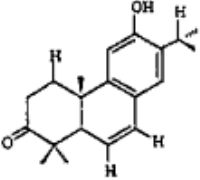
Carnosol



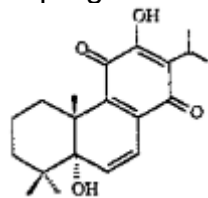
S. mellifera

Gram positivas

- *S. aureus*
- *B. subtilis*

<p>Salvicanol</p> 	<p><i>S. canariensis</i> <i>S. mellifera</i></p>	<p>Gram positivas</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>S. aureus</i>- <i>B. subtilis</i>
<p>Desmetilsalvicanol</p> 	<p><i>S. canariensis</i> <i>S. mellifera</i></p>	<p>Gram positivas</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>S. aureus</i>- <i>B. subtilis</i>
<p>Hipargenina A</p> 	<p><i>S. hypargeia</i></p>	<p>Gram positivas</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>S. aureus</i><p>Gram negativas</p><ul style="list-style-type: none">- <i>K. pneumoniae</i>
<p>Hipargenina B</p> 	<p><i>S. hypargeia</i></p>	<p>Gram positivas</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>S. aureus</i><p>Gram negativas</p><ul style="list-style-type: none">- <i>K. pneumoniae</i>
<p>Hipargenina C</p> 	<p><i>S. hypargeia</i></p>	<p>Gram positivas</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>S. aureus</i>- <i>B. subtilis</i>
<p>Hipargenina D</p> 	<p><i>S. hypargeia</i></p>	<p>Gram positivas</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>B. subtilis</i>

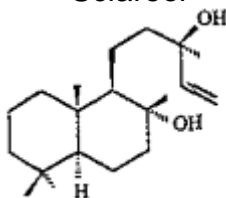
Hipargenina F



S. hypargeia

Gram positivas
- *S. aureus*
- *S. epidermidis*
- *M. tuberculosis*
Gram negativas
- *P. aeruginosa*

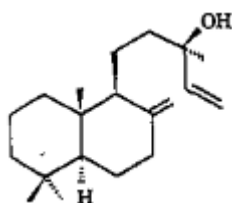
Sclareol



S. sclarea

Gram positivas
- *S. aureus*

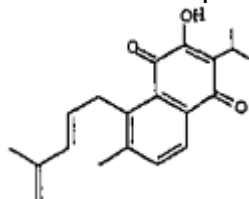
Manol



S. sclarea

Gram positivas
- *S. aureus*

2,3-dehidrosalvipisona



S. sclarea

Gram positivas
- *S. aureus*

Tabla 5. Contribución fitoquímica de algunas especies del género *Salvia*.

Autor y año	Género de <i>Salvia</i>	Contribución
Ríos, 1987	<i>S. longistyla</i>	Se aislaron compuestos de tipo triterpénico (β -Sitosterol, ácido oleanólico, ácido betulínico, β -D-glucósido de β -Sitosterol y 11 α 12 α -epoxilactonaoleanólica.
Aguilera, 1994	<i>S. mexicana</i>	Se aisló ac. ursólico del extracto hexánico y acetato de etilo, el cual posee efecto sobre la arteriosclerosis y también es utilizado como emulsificante
Islas, 2020	<i>S. fulgens</i>	Reportan que contiene terpenoides y flavonoides como: salvigenolide, sandraracopimárico, salvioccidentalín y β -sitosterol,
Islas, 2020	<i>S. melissodora</i>	Se encontró que contiene terpenoides y flavonoides, como: β -sitosterol ácido ursólico y melisodórico.
Islas, 2020	<i>S. wagneriana</i>	Se aislaron diterpenos clerodanos y 3 triterpenos (ácido ursólico y dos compuestos derivados del lupano.
López, 2020	<i>S. longispicata</i>	Se encontró la presencia de diterpenos y triterpenos como: ácido ursólico, ácido oleanólico flavonas y esteroides

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia frente a antimicrobianos es hoy en día una de las mayores amenazas para la salud mundial. Si bien, es un fenómeno natural que puede ser incrementado y acelerado por el uso indebido de estos fármacos. (OMS, 2020). Las bacterias han desarrollado mecanismos de defensa o protección para inactivarlos, lo que se traduce como mutación. Gracias a esto las infecciones causadas por este tipo de bacterias, suelen tener el peor pronóstico, haciendo difícil su tratamiento y aumentando la tasa de mortalidad.

Esto nos ha llevado a adoptar medidas legales restringiendo su libre venta, ya que la desinformación y la falta de recursos al atender una necesidad médica ha conllevado al uso inadecuado e indiscriminado.

Debido a estas circunstancias, se han buscado diversas alternativas para solucionar esta problemática, una de ellas es la herbolaria mexicana, la cual utiliza compuestos derivados de las plantas como un remedio efectivo contra diversas enfermedades.

JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional sigue cumpliendo un papel fundamental en la atención primaria de la salud, por ello es necesario realizar estudios que validen científicamente el uso de las plantas. Actualmente existen especies cuyas propiedades medicinales no han sido comprobadas, tal es el caso de *S. mexicana* por lo cual es importante evaluar el potencial que presenta al utilizarse como antimicrobiano, ya que algunas especies del género *Salvia* durante mucho tiempo han mostrado tener diversos usos en el tratamiento empírico de enfermedades, por lo cual es un fuerte antecedente para pensar que la especie *S. mexicana* contiene metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y antifúngica.

HIPÓTESIS

Con base a los antecedentes reportados, se sabe que el género *Salvia* presenta gran variedad de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas, dentro de ellas la antimicrobiana. Por lo tanto, al ser *S. mexicana* una especie del mismo género y además de sus antecedentes como antioxidante y antiinflamatorio, se infiere que los extractos de esta planta tendrán efecto frente a diferentes microorganismos patógenos y contaminantes.

OBJETIVOS

➤ **Objetivo general**

- ✓ Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *S. mexicana*.

➤ **Objetivos particulares**

- ✓ Determinar el rendimiento de los extractos de diferente polaridad de *S. mexicana*.
- ✓ Realizar pruebas cualitativas para identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los tres extractos.
- ✓ Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica
- ✓ Evaluar cuantitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica.
- ✓ Realizar una curva letal para determinar el efecto del extracto acetónico de

S. mexicana sobre el crecimiento bacteriano de las cepas más susceptibles.

- ✓ Realizar un análisis estadístico para determinar si hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colecta del material vegetal

La planta se colectó a finales del mes de noviembre del 2019 en la transición de temporada de lluvia a seca en el municipio de Acámbaro en la reserva natural Sierra de los Agustinos en Guanajuato con coordenadas (20°18'78" N; 100°64'90" W). Posteriormente se llevó un ejemplar al herbario IZTA de la FES Iztacala para su identificación.

2. Obtención de los extractos.

Para la obtención de los extractos de *S. mexicana* se utilizó la parte aérea de la planta mediante la técnica de maceración y concentración a presión reducida, como se menciona a continuación: Utilizando la planta seca y realizando una extracción directa, de forma que se obtuvo el peso total de la planta (459 g) se dividió en 3 (153 g), y se adicionó a 3 matraces para agregarle a cada uno su respectivo disolvente, hexano acetona y metanol, la maceración se realizó por triplicado (**Apéndice 2**). Por último, se determinó el rendimiento con relación al peso de la planta seca mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{g de extracto obtenido}}{\text{g de planta seca utilizada}} \times 100\%$$

3. Pruebas cualitativas de identificación de metabolitos secundarios.

Los extractos se analizaron mediante las pruebas cualitativas descritas en el **Anexo 8**, las cuales evidencian la presencia o ausencia de compuestos tales como alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, glucósidos, saponinas, taninos, terpenos y triterpenos.

Se utilizó aproximadamente 2 mg de cada extracto y se reconstituyó en 1 mL de cada disolvente, utilizando los reactivos específicos para cada prueba.

4. Cepas bacterianas y hongos.

Para realizar la evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antibacteriana y antifúngica se utilizaron 27 cepas de importancia médica obtenidas del cepario del Departamento de Bioactividad de Productos Naturales en la UBIPRO, FES Iztacala, en la siguiente tabla se enlistan los microorganismos utilizados.

Tabla 6. Microorganismos utilizados en los bioensayos

	Microorganismo	Clasificación, serotipo o lugar de donde fueron donadas
CEPAS BACTERIANAS		
Gram positivas	- <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 14506
	- <i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240a *
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 14756
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 23MR
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	CC
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	CUSI
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	FES-C
	- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	FES-C

Gram negativas	- <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048*
	- <i>Enterobacter gergoviae</i>	ATCC 33028*
	- <i>Escherichia coli</i>	ATCC 82MR
	- <i>Escherichia coli</i>	CUSI
	- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CUSI
	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853*
	- <i>Salmonella enterica</i> subsp. entérica serovar typhi	ATCC 7251*
	- <i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430
	- <i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756*
	- <i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 39540
	- <i>Vibrio cholerae</i>	Silvestre
CEPAS FÚNGICAS		
Levaduras	- <i>Candida albicans</i>	ATCC 17MR
	- <i>Candida glabrata</i>	CC
	- <i>Candida glabrata</i>	CC
	- <i>Candida tropicalis</i>	CC
H. filamentosos	- <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CDBB-H-1112
	- <i>Aspergillus niger</i>	FES-I
	- <i>Fusarium moniliforme</i>	CDBB-H-265
	- <i>Fusarium sporotrichum</i>	FES-I

CC: Caso clínico **CUSI:** Clínica Universitaria de Salud Integral Iztacala, **FES-C** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, **FES-I** Facultad de Estudios Superiores Iztacala, **MR** Multirresistente. *Cepas obtenidas del cepario del CINVESTAV-IPN

5. Evaluación de la actividad antibacteriana.

➤ Evaluación cualitativa.

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se realizó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Bauer (**Apéndice 3**). Utilizando 2.0 mg del extracto disuelto en 10 μL de disolvente para impregnar cada sensidisco y como control positivo 25 μg de cloranfenicol los cuales se encuentran en 5 μL del medicamento. Todos los bioensayos se realizarán por triplicado, reportando los resultados del halo de inhibición en mm, para obtener el promedio y la desviación estándar (Koneman et al., 1996, citado en Pérez, 2016).

➤ Evaluación cuantitativa.

Para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó el método modificado de microdilución en caldo (Apéndice 4). Las concentraciones empleadas del extracto acetónico fueron: 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 mg/mL mientras que las del control positivo (cloranfenicol) fueron: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se realizó una solución stock del extracto de 40mg/500 μL * y 88 μL /1378 μL * para el cloranfenicol mediante las cuales se obtuvieron todas las concentraciones a utilizar, (recordando que la concentración de la solución stock se hace al doble debido a que se diluye dos veces al momento de realizar el experimento ya que se le adiciona 50 μL del inóculo en la solución que ya teníamos preparada). Una vez realizados los cálculos se estimó el volumen de solución stock a adicionar a cada uno de los viales con caldo MH con 1% del tensoactivo Tween (para aumentar la solubilidad del extracto) considerando que el volumen final debe ser de 1.5 mL.

Para la preparación del inóculo se realizó una suspensión de las cepas bacterianas seleccionadas con una concentración de $1.5 \times 10^8 \text{UFC}/\text{mL}$

(siguiendo la escala de McFarland), posteriormente se tomó una alícuota de 10 μL y se adicionó a un vial con 10 mL de caldo para obtener una concentración de 1.5×10^5 UFC/mL

Por último, se llenaron los pozos colocando primero 50 μL de cada concentración del extracto y luego 50 μL de la suspensión bacteriana. Lo mismo se realizó con el control positivo.

Cabe mencionar que el estudio se realizó para las 5 cepas que fueron susceptibles con 3 repeticiones por cada una.

Posteriormente se adicionó 50 μL del revelador TTC al 0.08 % a cada uno de los pozos y se incubó durante media hora a 37°C.

La CMI se estimó considerando la disminución drástica del crecimiento bacteriano, mientras que CBM se consideró como la concentración en donde ya no se observó crecimiento (Koneman et al., 1985).

*Las concentraciones de las soluciones stock ya están preparadas al doble.

6. Evaluación de la actividad antifúngica.

➤ Evaluación cualitativa.

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de las cepas de hongos miceliados se realizó mediante la inhibición del crecimiento radial (Apéndice 5). Para la preparación de los discos se impregnó 2 mg del extracto en 10 μL del disolvente correspondiente y 60 μg de ketoconazol para los discos del control positivo utilizando como medio de cultivo agar PDA (papa dextrosa agar). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. La evaluación de las cepas levaduriformes se llevó a cabo de la misma forma en que se realizó con las cepas bacterianas (Apéndice 3), utilizando agar PDA y usando como control positivo 30 μg de nistatina (Wang y Bun, 2002).

➤ Evaluación cuantitativa.

Se determinó la concentración fungicida media (CF₅₀), mediante la inhibición del crecimiento radial únicamente para los hongos miceliados, ya que los levaduriformes no mostraron inhibición. Se utilizaron placas de agar PDA de 24 pozos (Apéndice 6). Las concentraciones que se emplearon para los bioensayos fueron de 2 mg/mL a 7 mg/mL, realizándose cada bioensayo por triplicado y utilizando como testigo al hongo sin extracto (Wang y Bun, 2002). Cabe mencionar que no se realizó la prueba para el extracto hexánico debido a que no se obtuvo el rendimiento necesario para llevar a cabo dicho experimento.

El criterio para la lectura de los resultados fue: esperar el tiempo necesario para que el micelio cubriera la superficie del agar en los pozos sin extracto (testigos), posterior a eso, se leyeron los pozos experimentales.

Los resultados de los hongos *T. mentagrophytes* y *F. moniliforme* se leyeron después de 72 horas de crecimiento, los de *A. niger* y *F. sporotrichum* se leyeron a las 96 horas después de inocular los pozos con el micelio.

7. Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento).

La determinación del efecto del extracto acetónico sobre el crecimiento bacteriano se realizó de acuerdo con el método propuesto por Kubo et al., (1993) (Apéndice 7). Tomando como criterio de selección el valor de CMI más bajo de las cepas bacterianas frente al extracto acetónico y la importancia médica de las cepas, se eligió a las cepas *V. cholerae* ATCC 39540 y *V. cholerae* silvestre. Se llevó a cabo un monitoreo del crecimiento de las poblaciones bacterianas en 7 tiempos durante 24 horas, mismas que se expusieron a diferentes concentraciones de extracto 1/2 CMI 0.375 mg/mL, CMI 0.75 mg/mL y CBM 3.0 mg/mL y un grupo testigo (Kubo et al., 1993).

8. Pruebas estadísticas.

Para determinar si existe diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana de los extractos con respecto al control se realizó un análisis estadístico denominado ANOVA de un factor. En todos los casos se consideró como estadísticamente significativo una $P < 0.05$.

Para la determinación de la CF_{50} de los extractos sobre los hongos filamentosos, se graficaron las concentraciones evaluadas frente al porcentaje de inhibición del crecimiento radial, se realizó una regresión logarítmica y se obtuvo la ecuación de la curva para obtener la CF_{50} .

RESULTADOS

Tabla 7. Datos etnobotánicos de *S. mexicana*

Nombre científico:	<i>Salvia mexicana</i>
Nombre común:	Tlacote*
Parte utilizada:	Aérea
Uso:	Ninguno
Forma de uso:	Ninguno
Zona de colecta:	Reserva natural Sierra de los Agustinos, Acámbaro Guanajuato. (20°18'78" N; 100°64'90" W)
Fecha de colecta:	28 noviembre 2019
Colector:	Erick Nolasco Ontiveros
Número de registro:	Izta-3325

*El nombre común de la planta se tomó del Instituto Nacional de Ecología.

1. Rendimiento de los extractos

Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento de los extractos, se observa que el extracto metanólico fue el que presentó mayor rendimiento (3%), seguido del extracto acetónico (2.5%) mientras que el extracto hexánico fue el que se presentó en menor cantidad (0.2%); por lo que la suma de los rendimientos polares (metanol y acetona) indican que nuestra planta contiene en su mayoría compuestos de mayor polaridad (Tabla 8).

Tabla 8. Rendimientos de los extractos de *Salvia mexicana*

Extracto	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)*
Hexánico	0.3	0.2
Acetónico	3.8	2.5
Metanólico	4.5	3

*Rendimiento calculado con respecto a 153 g de planta seca, para cada extracto.

2. Caracterización fitoquímica de los extractos

En las pruebas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios se observaron similitudes en el extracto acetónico y metanólico, ambos presentaron fenoles, taninos, flavonoides y terpenos, mientras que el extracto hexánico únicamente dio positivo a la presencia de terpenos.

En la **tabla 9**. se muestran los resultados obtenidos de las pruebas cualitativas de metabolitos secundarios.

Tabla 9. Composición química de los extractos de *S. mexicana*.

Prueba	Extracto		
	Hexánico	Metanólico	Acetónico
Fenoles	-	+	+
Taninos	-	+	+
Saponinas	-	-	-
Glucósidos	-	-	-
Alcaloides	-	-	-
Flavonoides	-	+	+
Cumarinas	-	-	-
Terpenos	+	+	+
Triterpenos	-	-	-
Esteroides	-	-	-

(+) Respuesta positiva (-) Respuesta negativa

3. Actividad antimicrobiana

➤ Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

En la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se observó que el único extracto que presentó actividad sobre las cepas bacterianas fue el acetónico; frente a 3 cepas Gram negativas y 2 cepas Gram positivas las cuales se muestran en la **tabla 10**. La cepa con mayor halo de inhibición fue *V. cholerae* ATCC 39540 con (8.00 ± 1.00 mm) mientras que el de menor halo de inhibición fue *S. aureus* ATCC

23MR y *S. aureus* FES-C con $(6.33 \pm 0.58 \text{ mm})$. En general, los halos de inhibición del cloranfenicol fueron mayores que los de los extractos.

Los resultados de la actividad antibacteriana del extracto acetónico mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) comparadas con el control (cloranfenicol).

Tabla 10. Prueba cualitativa de la actividad antibacteriana de *S. mexicana*.

Microorganismos	Control positivo	Extractos		
	Cloranfenicol	Hexánico	Acetónico	Metanólico
Gram negativas				
<i>V. cholerae</i> ATCC 39540	25.67 \pm 0.58	Na	8.00 \pm 1.00	Na
<i>V. cholerae</i> silvestre	25.67 \pm 1.53	Na	7.67 \pm 0.58	Na
<i>S. enterica</i> ATCC 7251*	22.00 \pm 1.00	Na	6.67 \pm 0.58	Na
Gram positivas				
<i>S. aureus</i> ATCC 23MR	21.33 \pm 0.58	Na	6.33 \pm 0.58	Na
<i>S. aureus</i> FES-C	25.33 \pm 0.58	Na	6.33 \pm 0.58	Na

Halos de inhibición en mm. Valores promedio obtenidos de tres repeticiones \pm DE.
 Los sensidiscos se probaron con 2 mg de extracto por disco. Na: no presentó actividad.

➤ **Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica**

El extracto acetónico no fue activo para ninguna cepa levaduriforme sin embargo, para las cepas de hongos miceliados, se obtuvo que los 3 extractos (hexánico, acetónico y metanólico) inhibieron al menos a 2 cepas de hongos cada uno; en el caso de *F. moniliforme* y *T. mentagrophytes*, los 3 extractos fueron activos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 11. Evaluación cualitativa de la actividad de *S. mexicana* frente al extracto acetónico, metanólico y hexánico.

Microorganismo	Extractos		
	Hexánico	Acetónico	Metanólico
<i>T. mentagrophytes</i>	+	+	+
<i>A. niger</i>	-	+	+
<i>F. moniliforme</i>	+	+	+
<i>F. sporotrichum</i>	-	+	+

Simbología: +, presentó actividad; -, no presentó actividad

➤ **Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana**

Mediante el método de microdilución en caldo se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acetónico de *S. mexicana* frente a las 5 cepas que fueron susceptibles en la prueba cualitativa; se observó que las bacterias con valores más bajos de CMI y CBM fueron *V. cholerae* ATCC 39540 y *V. cholerae* silvestre lo que indica que fueron las cepas bacterianas que presentaron mayor sensibilidad con una concentración de 0.75 mg/mL, es decir, se requiere de esta concentración para inhibir drásticamente su crecimiento y a concentraciones de 3.0 mg/mL se inhibe por completo el crecimiento. En la **tabla 12**, se muestran los resultados obtenidos para las 5 cepas:

Tabla 12. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana del extracto acetónico de *S. mexicana*. Valores de CMI y CBM (mg/mL).

Cepa	Control positivo		Extracto acetónico	
	Cloranfenicol		CMI	CBM
	CMI	CBM		
<i>V. cholerae</i> ATCC 39540	1.0	2.0	0.75	3.0
<i>V. cholerae</i> silvestre	1.0	2.0	0.75	3.0
<i>S. aureus</i> FES-C	5.0	7.0	>3.0	>3.0
<i>S. aureus</i> ATCC 23MR	6.0	7.0	>3.0	>3.0
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	6.0	7.0	3.0	>3.0

➤ **Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica**

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas para los hongos miceliados, se realizó la prueba cuantitativa mediante el método de difusión en placa para la obtención de la concentración fungicida media (CF₅₀), utilizando al extracto acetónico y metanólico, omitiendo al extracto hexánico debido a que la cantidad era insuficiente para realizar dichas pruebas.

✓ **Extracto acetónico**

En la **figura 2**, se muestra que el extracto acetónico inhibió al 58.3% de la población *A. niger*. a una concentración de 7 mg/mL.

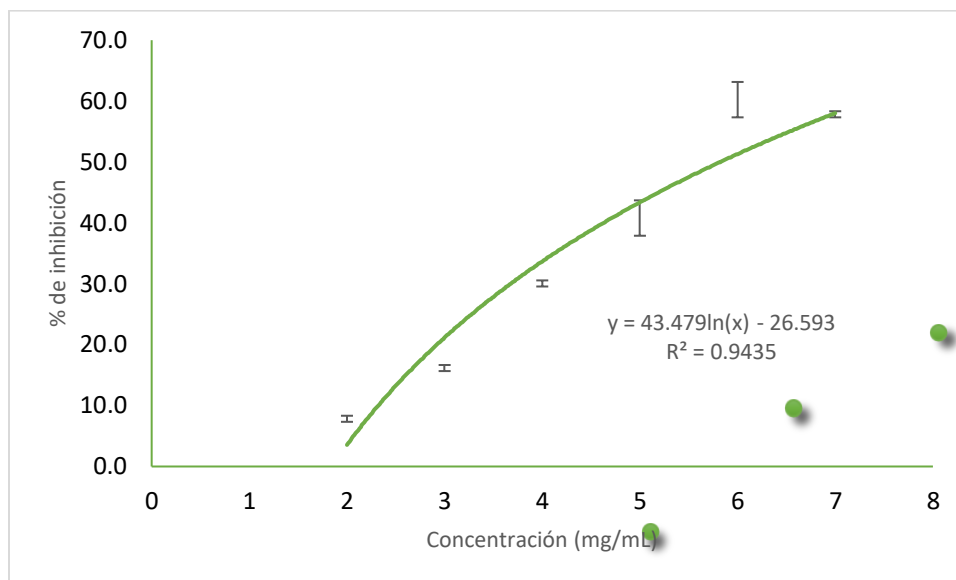


Figura 2. Inhibición del crecimiento radial del extracto acetónico de *S. mexicana* sobre la cepa *A. niger*.

En la **figura 3**, se muestra que el extracto acetónico inhibió al 64.3% de la población de *F. moniliforme*. a una concentración de 6 mg/mL.

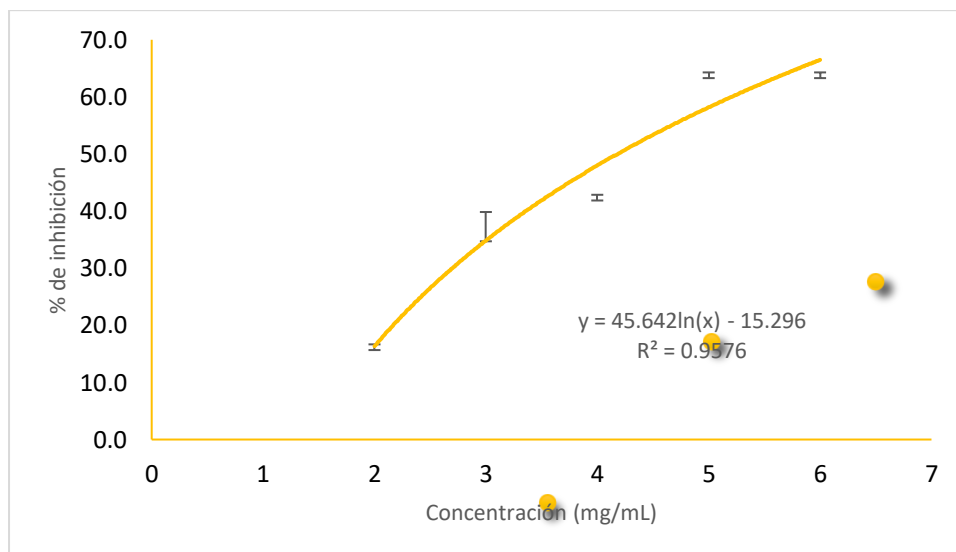


Figura 3. Inhibición del crecimiento radial del extracto acetónico de *S. mexicana* sobre la cepa *F. moniliforme*.

En la **figura 4**, se muestra que el extracto acetónico inhibió al 92.9% de la población de *T. mentagrophytes*. a una concentración de 6 mg/mL.

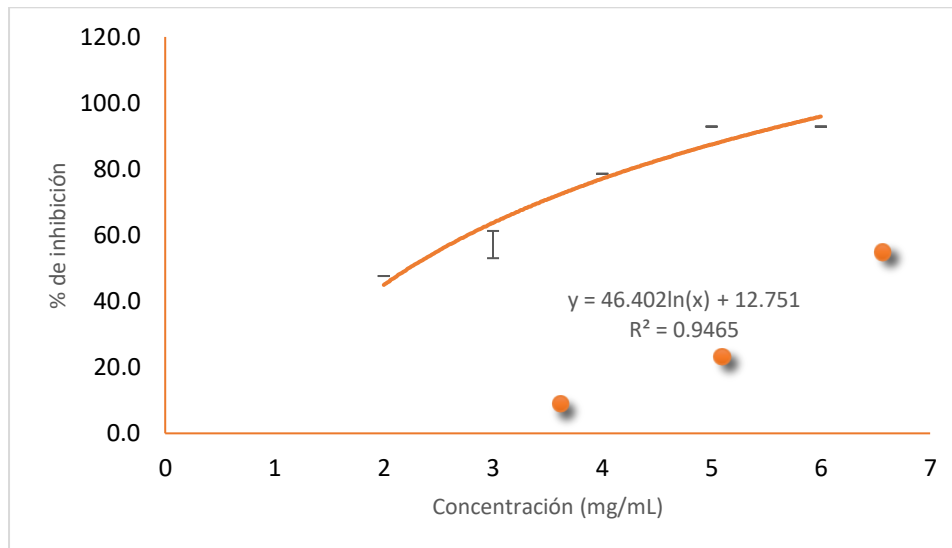


Figura 4. Inhibición del crecimiento radial del extracto acetónico de *S. mexicana* sobre la cepa *T. mentagrophytes*.

Mediante este método no se observó inhibición del crecimiento radial en el hongo *F. sporotrichum*, sin embargo, el hongo expuesto al extracto acetónico mostró (en apariencia) menor desarrollo de micelio en comparación con el testigo.

✓ Extracto metanólico

En la **figura 5**, se muestra que el extracto metanólico inhibió al 55.6% del crecimiento de *A. niger* a una concentración de 7 mg/mL.

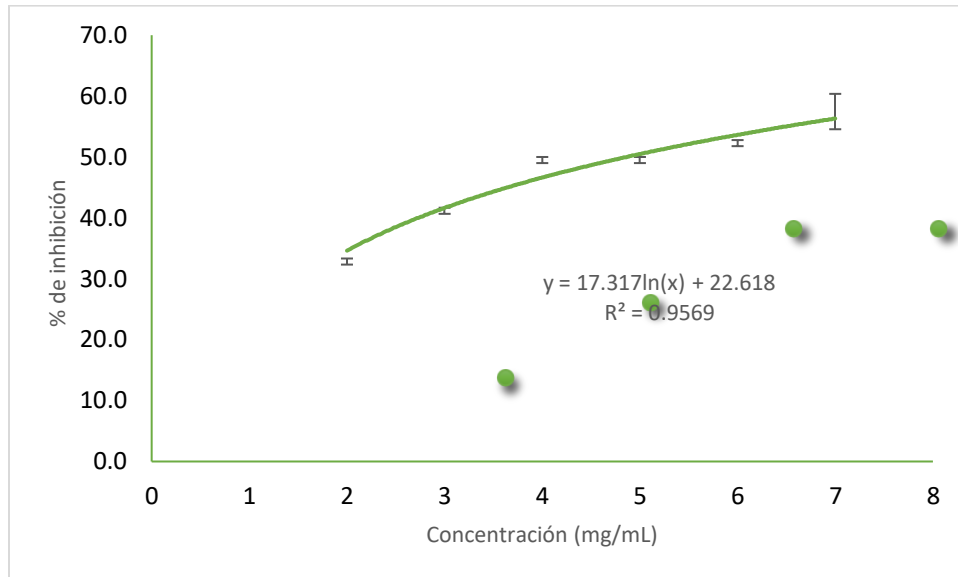


Figura 5. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de *S. mexicana* sobre la cepa *A. niger*.

En la **figura 6**, se muestra que el extracto metanólico inhibió al 57.1% de la población de *F. moniliforme*, a una concentración de 6 mg/mL.

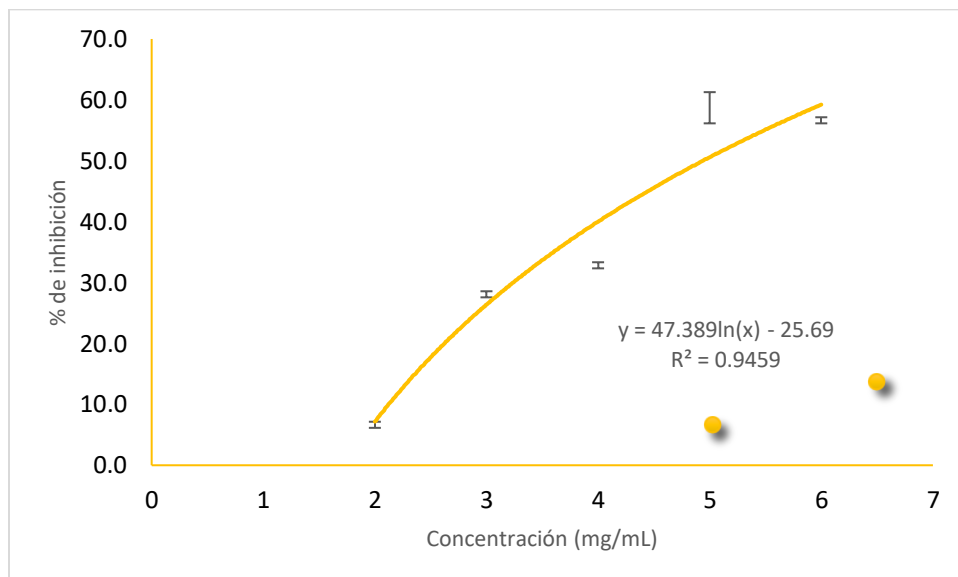


Figura 6. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de *S. mexicana* sobre la cepa *F. moniliforme*.

En la **figura 7**, se muestra que el extracto acetónico inhibió al 85.7% de la población de *T. mentagrophytes* a una concentración de 7 mg/mL.

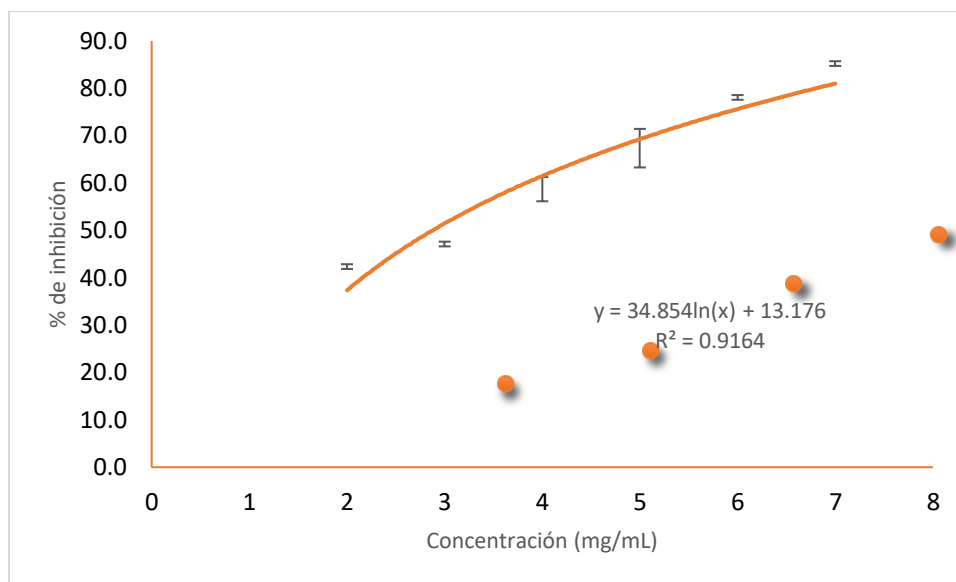


Figura 7. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de *S. mexicana* sobre la cepa *T. mentagrophytes*.

F. sporotrichum se determinó como no activo, ya que en apariencia se observa mayor desarrollo del micelio en los pozos experimentales con el extracto, en comparación con el testigo.

Tabla 13. Concentración fungicida media (CF₅₀) de los extractos de *S. mexicana*.

Cepa	Extracto		
	Control Ketoconazol (mg/mL)	Acetónico (mg/mL)	Metanólico (mg/mL)
<i>A. niger</i> .	0.015	5.82	4.86
<i>F. moniliforme</i> .	0.002	4.18	4.94
<i>F. sporotrichum</i>	0.008	No activo	No activo
<i>T. mentagrophytes</i> .	0.002	2.23	2.88

4. Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento).

En la siguiente gráfica se observa el efecto del extracto acetónico sobre el crecimiento de la cepa *V. cholerae* ATCC 39540 en donde se muestra que el testigo, $1/2$ CMI y CMI tuvieron un crecimiento exponencial a partir de las 2 horas exceptuando la CBM que muestra una disminución total de la población a partir de las 2 horas. La $1/2$ CMI se muestra por debajo del testigo a partir de las 2 horas, sin embargo, en el último punto comienza a ascender pudiéndose deber a las condiciones de estrés. La CMI también se muestra por debajo del control pero con una tendencia muy parecida a la $1/2$ CMI.

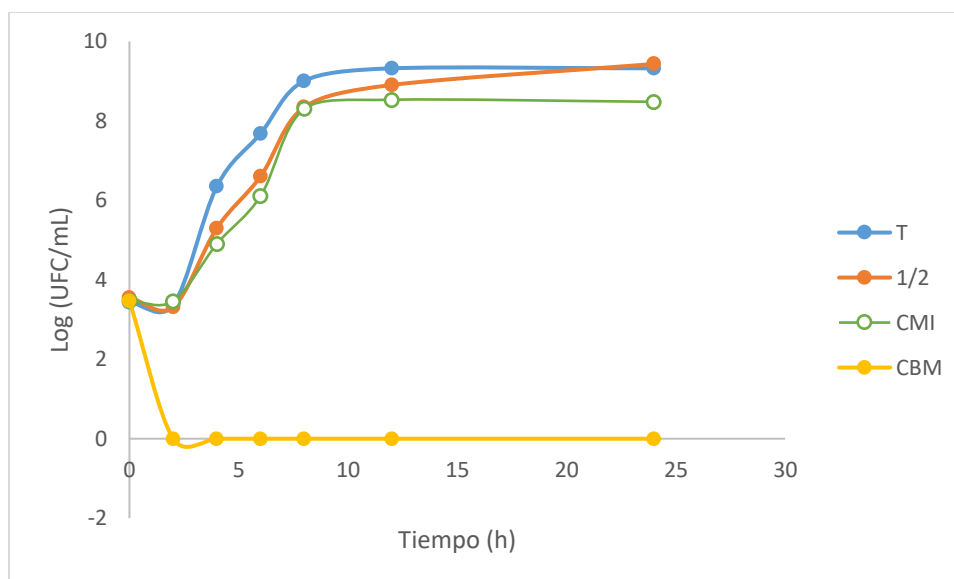


Figura 8. Efecto del extracto acetónico sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* ATCC 39540, durante 24 horas. Testigo= sin extracto, $1/2$ CMI= 0.375 (mg/mL), CMI=0.75 (mg/mL), y CBM= 3.0 (mg/mL).

En la siguiente gráfica se observa el efecto del extracto acetónico sobre el crecimiento de la cepa *V. cholerae* silvestre el cual tiene un comportamiento muy similar a la cepa *V. cholerae* ATCC 39540 ya que muestra que el testigo, $1/2$ CMI y CMI tuvieron un crecimiento exponencial a partir de las 2 horas exceptuando la CBM que muestra una disminución total de la población a partir de esa hora. La $1/2$ CMI se comienza a mostrar por debajo del testigo a partir de las 4 horas, sin embargo, en el último punto comienza a ascender más que el testigo pudiéndose deber a las condiciones de estrés. La CMI también se comienza a mostrar por debajo del control a partir de las 2 horas manteniendo esa tendencia.

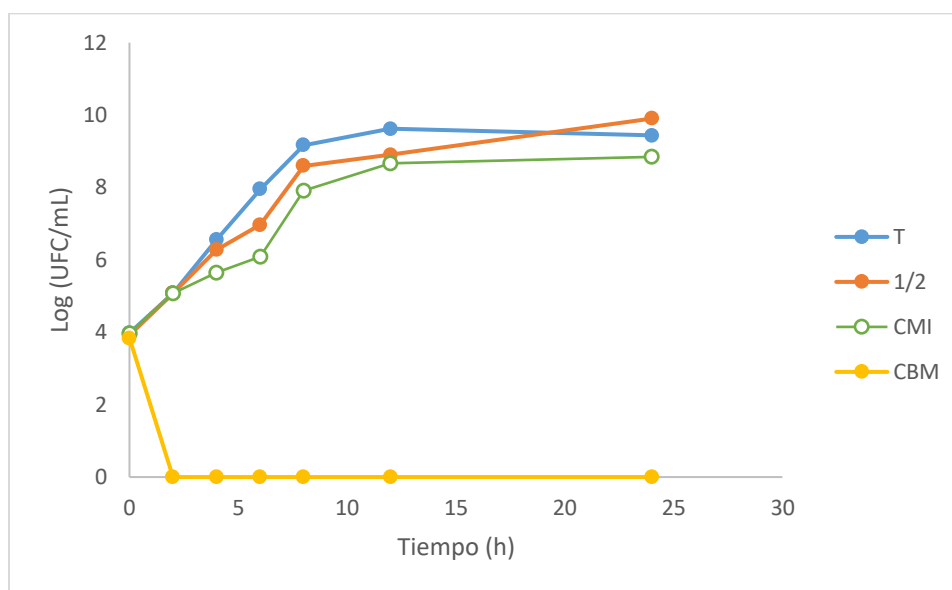


Figura 9. Efecto del extracto acetónico sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* silvestre, durante 24 horas. Testigo= sin extracto, $1/2$ CMI= 0.375 (mg/mL), CMI=0.75 (mg/mL), y CBM= 3.0 (mg/mL).

DISCUSIÓN

Al realizar un experimento siempre es importante obtener los rendimientos de cada proceso, ya que nos sirve como una medida de evaluación y comparación así como para la planificación de nuevos experimentos. De los tres extractos obtenidos el metanólico fue el que presentó mayor rendimiento (3%), mientras que el extracto hexánico fue el que se obtuvo en menor cantidad (0.2%). La suma de los rendimientos polares (metanol y acetona) indican que nuestra planta contiene en su mayoría compuestos de alta polaridad. En general el rendimiento total de los extractos fue de 5.7%.

Aunque los tres extractos fueron recolectados tratados y almacenados en las mismas condiciones, el extracto hexánico tuvo menor rendimiento, esto no quiere decir que los tres extractos deban de estar en la misma proporción, simplemente la planta sintetiza metabolitos según sus necesidades. La producción de estos compuestos está controlada por factores bióticos y abióticos como temperatura, humedad, nutrientes, agua, estrés ambiental, contaminación e interacción con otros microorganismos (Jones y Hartley, 1999). Por lo cual los metabolitos presentes y el rendimiento dependen de la época de colecta, en este caso *S. mexicana* tiene su auge en temporada de lluvias, (en la reserva natural Sierra de los Agustinos en Guanajuato, la temporada de lluvias es de junio a septiembre) pero el ejemplar con el que se realizó dicho experimento fue recolectado en la transición de la temporada de lluvias a seca (finales de noviembre), por lo que presentaba escasas flores. Esto se podría asociar al bajo rendimiento de los extractos en general y del extracto hexánico, ya que los metabolitos secundarios se acumulan en diversas partes de la planta dependiendo su función, pudiendo estar en el tronco, corteza, hojas o flor (Díaz, 2017).

Al realizar las pruebas para detección de grupos de metabolitos secundarios, se observó que los extractos acetónico y metanólico presentaron la mayor diversidad, en comparación con el hexánico que solo fue positivo para terpenos. Los extractos mencionados, mostraron los mismos grupos de metabolitos; entre ellos los fenoles, taninos flavonoides y terpenos. Aguilera en 1994 menciona que se han aislado

principalmente monoterpenos, sesquiterpenos en los extractos de *S. mexicana*, Ríos en 1987 detectó la presencia de triterpenos. Islas en 2013 y López en 2020 mencionan la presencia de terpenos y flavonoides lo cual lo podemos asociar a los metabolitos encontrados en nuestros extractos.

En cuanto a la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se puede decir que estos resultados tienen gran importancia ya que nos indica si un extracto presenta o no actividad. Cabe mencionar que los extractos polares, al contener metabolitos secundarios de naturaleza polar, tienden a difundir con mayor eficiencia en el medio acuoso, como es el agar, que en comparación con los extractos no polares, ya que al no tener afinidad por el medio acuoso, se dificulta su difusión en las placas experimentales y con frecuencia presenta halos de inhibición más pequeños (Aguilera, 2020).

En dicha prueba cualitativa se observó que el único extracto que tuvo efecto frente a cepas bacterianas fue el acetónico, lo que coincide con lo reportado por Ghezelbash y col. en 2015 que concluyeron que el extracto acetónico de la especie *S. officinalis* presenta mayor poder antimicrobiano en comparación con el etanólico y acuoso.

De igual forma Ghezelbash y col. en 2015 y Mounyr y col. en 2014 reportaron que los extractos polares de *Salvias* son los que presentan mayor actividad antimicrobiana, pudiéndose deber a los fenoles, taninos, flavonoides y terpenos que se encuentran presentes en dichos extractos y nulos en el extracto no polar.

Con base en el promedio del diámetro de los halos de inhibición se observó que de las 20 cepas bacterianas y 3 levaduras solo 5 cepas fueron susceptibles, 3 Gram-negativas y 2 Gram-positivas siendo una de ellas multirresistente. Las dos Gram-positivas fueron *S. aureus* (ATCC 23MR y FES-C) resultando coincidir con lo antes reportado, ya que tanto los estudios de Ghezelbash y col. en 2015 y Mounyr y col. en 2014 reportaron que *S. aureus* fue susceptible frente a los extractos polares de *S. officinalis*.

Además, en la **tabla 4**, se puede observar que los diterpenos aislados de diferentes *Salvias* inhiben en su mayoría a *S. aureus* lo que coincide con los resultados

obtenidos, llevándonos a la posible conclusión de que el efecto antimicrobiano se encuentra en los terpenos presentes en el extracto.

La importancia de esta cepa radica en su potencial patógeno y oportunista ya que tiene una capacidad de invadir, persistir y replicarse en cualquier tejido humano, por lo que puede causar síndromes patológicos tales como abscesos, bacteriemias, osteomielitis, endocarditis o conjuntivitis (García, 2006).

De las bacterias Gram negativas que resultaron susceptibles al extracto acetónico fueron: *S. enterica* ATCC 7251, *V. cholerae* ATCC 39540 y *V. cholerae* silvestre, resultado de gran interés debido a su gran importancia a nivel mundial siendo la salmonelosis una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas en el mundo y cólera una amenaza mundial por la rapidez en que la diarrea conduce a la deshidratación. Se dice que las enfermedades diarreicas son una causa principal de mortalidad y morbilidad en la niñez en el mundo y a pesar de que ya existen tratamientos establecidos para aliviar dichas enfermedades la resistencia frente a antimicrobianos, sigue siendo un problema de salud mundial (OMS, 2020).

Los resultados de las pruebas de actividad antibacteriana del presente estudio, revelan que el extracto acetónico de *S. mexicana* no muestra una tendencia de inhibición hacia un grupo de microorganismos en particular. Actuando como un antibiótico de amplio espectro para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. De modo que los extractos pudieran estar bloqueando la síntesis de factores metabólicos, inhibiendo la síntesis proteica o el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos (Calvo y Martínez, 2009).

También podemos proponer que la inhibición del crecimiento bacteriano se debe a que los disolventes polares en la extracción arrastran grupos fenólicos, que al tener un grupo hidroxilo, característico de estos compuestos, forma puentes de hidrógeno en los centros enzimáticos de las bacterias, lo que conlleva a la alteración de su metabolismo. (Coronado, 2019). También podría deberse a la presencia de flavonoides, que tienen la capacidad de inhibir la síntesis de DNA y RNA, ya que también tienen grupos hidroxilo libres, con los que pueden formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas, una estructura plana, semejante a la

estructura de las bases púricas y pirimídicas, que se pueden intercalar entre la doble hélice. Algunas flavonas han mostrado tener un mayor efecto inhibitorio en la síntesis de ácidos nucleicos. (Hernández, 1999).

En el estudio cuantitativo se obtuvo que *S. aureus* (FES-C y ATCC 23MR) presentaron una MIC y CBM mayor a 3 mg/mL lo que coincide con Ghezelbash y colaboradores (2015) donde indican que la MIC y CBM del extracto acetónico de *S. officinalis* es de 35 mg/mL y 40 mg/mL respectivamente. Para *S. enterica* ATCC 7251 se obtuvo una CMI es de 3.0 mg/mL y una CBM mayor a 3 mg/mL. *V. cholerae* (ATCC 39540 y silvestre) fueron los que presentaron mayor sensibilidad frente al extracto acetónico, con una CMI de 0.75 mg/mL y CBM de 3.0 mg/mL.

Cabe destacar que la CMI y CBM es inversamente proporcional al efecto inhibitorio, es decir mientras más pequeña sea la concentración, mayor será el efecto inhibitorio. Aunque no siempre es recomendable tener una concentración muy pequeña debido a que puede tener efectos tóxicos, ya que en la farmacología siempre se prefiere que el fármaco tenga una ventana de actividad biológica amplia. Las concentraciones obtenidas son altas comparadas con las del control positivo (cloranfenicol), que presenta valores 1 a 6 µg/mL sin embargo estos valores dependen de si la CMI y CBM se realizaron con el extracto o con el principio activo puro ya que en un extracto hay gran variedad de compuestos y mezclas de ellos, dentro de los cuales se encuentran los metabolitos secundarios, mismos que pueden tener interacciones entre sí y como consecuencia dar acciones de sinergia (potencializa el efecto antimicrobiano) o de antagonismo (disminuye o anula dicho efecto) es decir, posterior a confirmar que el extracto tiene efecto antimicrobiano, se procede a separar y purificar a los compuestos presentes, de esta forma podemos evaluar cada compuesto por separado, para saber si tiene mayor o menor efecto, debido a las interacciones que tiene con las otras moléculas presentes. En efecto, si aislamos los compuestos podemos encontrar dos resultados, primeramente encontrar que el principio activo sea más potente al estar puro y segundo que al aislar al compuesto la inhibición sea menor, esto significaría que no es solo un compuesto el responsable del efecto, si no varios realizando sinergia.

Para evaluar el efecto del extracto acetónico de *S. mexicana* en las cepas más susceptibles: *V. cholerae* (ATCC 39540 y silvestre) se llevó a cabo una curva letal, en donde se observó que efectivamente las dos cepas fueron inhibidas frente al extracto y que el tiempo en que tarda en inhibir al 100% de la población es de 2 horas con una concentración de 3.0 mg/mL (CBM).

Se observa las **figuras 8 y 9**, que la tendencia de la CMI como la CBM estuvieron por debajo del grupo testigo, lo que nos lleva a concluir que el extracto acetónico si inhibe a la población de bacterias y se comporta como bactericida.

Como se mencionó con anterioridad pesar de que la concentración obtenida sea mayor a la del testigo cabe destacar que se tiene un extracto (conjunto de compuestos no purificados). Como perspectiva se recomendaría realizar un análisis químico cuantitativo y una cromatografía para identificar y separar a los compuestos presentes y determinar cuál es el o los compuestos que tienen la actividad antibacteriana.

En la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica se observó que los extractos de *S. mexicana* no inhibieron a ninguna cepa levaduriforme, sin embargo, para los hongos miceliados se observó que los extractos metanólico y acetónico inhibieron el crecimiento de los 4 hongos (*T. mentagrophytes*, *A. niger*, *F. moniliforme* y *F. sporotrichum*) mientras que el extracto hexánico solo inhibió a *T. mentagrophytes* y *F. moniliforme*.

En la prueba cuantitativa se obtuvo que la cepa más susceptible a los extractos metanólico y acetónico fue *T. mentagrophytes* obteniendo una CF_{50} de 2.23 mg/mL a las 2 horas de incubación para el extracto acetónico mostrando tener una inhibición total de 92.9%. Para el extracto metanólico se obtuvo una CF_{50} de 2.88 mg/mL a las 3 horas de inhibición con una inhibición total de 85.7%, obteniendo los dos una excelente correlación de 0.94 y 0.91 respectivamente.

Estas concentraciones a pesar de haber sido las CF_{50} más pequeñas de las obtenidas con los 4 hongos miceliados, no fueron menores que el control, lo que quedaría decir que se necesitan mayores concentraciones para inhibir al 50% de la población, Esto no demuestra que el resultado sea insignificante debido a que se

probó un extracto completo, sin embargo se demuestra su potencial antifúngico, que puede ser utilizado como una alternativa útil en comunidades donde no se tiene acceso a medicamentos, se practique la herbolaria o bien una alternativa para la creación de nuevos fármacos.

Para *A. niger* la CF_{50} del extracto acetónico fue de 5.82 mg/mL con una inhibición de hasta 58.3% y para el extracto metanólico 4.86 mg/mL con una inhibición de hasta 55.6%, mientras que para *F. moniliforme* la CF_{50} fue de 4.18 mg/mL para el acetónico con 64.3% de inhibición máxima y 4.94 mg/mL para el extracto metanólico con un 57.1% de inhibición. *F. sporotrichum* no mostró inhibición en el crecimiento pero sí en apariencia (micelio) por lo que no se consideró en los resultados. Cabral y col. en el 2013 mencionan que los extractos están conformados por una gran variedad de metabolitos secundarios, lo que hace difícil relacionar un solo compuesto con la actividad antifúngica. Si bien Ríos en 2018 menciona que el extracto de *S. sessei* tiene un efecto mayor al probar el extracto completo que al probar a sus componentes por separado, por lo que tiene un efecto sinérgico que ocasiona su poder antifúngico provocando que existan diferentes blancos donde el extracto actúe y haciendo que los hongos patógenos sean menos propensos a desarrollar resistencia contra el extracto. De igual forma se propone que el extracto de *S. sessei* tiene como mecanismo de acción el daño a la pared celular y a la membrana.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Moreno en 2019 quien menciona que 55 especies pertenecientes a 27 géneros de la familia Lamiaceae tienen potencial antifúngico que puede ser aplicable en la industria farmacéutica contra hongos patógenos.

Cabe destacar que la importancia de estos resultados radica en el poder patógeno e importancia médica de las cepas, como *T. mentagrophytes* que es uno de los 5 dermatofitos más frecuentes en México y en el mundo, de los principales causantes de diferentes tiñas (cabeza, barba, bigote, cuerpo, ingle, uñas y pies) que afectan a todo tipo de población. De igual forma *F. moniliforme* es un hongo oportunista que se encuentra comúnmente en el maíz y es causante de eumicetomas y queratitis

micóticas o *A. niger* que es un hongo contaminante, parte de la microbiota humana, en diversas zonas del cuerpo y que al ser oportunista, puede causar aspergilosis pulmonares cutáneas onicomycosis o saprofitación en pacientes quemados (Bonifaz, 2012).

Por último, podemos asociar que los resultados obtenidos con los hongos miceliados pueden relacionarse con la época de colecta, ya que, al ser recolectada en la transición de temporada de lluvia a seca, al haber más humedad en el ambiente propicia el auge para la proliferación de diversos hongos contaminantes, por lo cual se propone que la planta produce en esta época más metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

CONCLUSIONES

La especie *S. mexicana* tiene actividad antimicrobiana, frente a bacterias Gram positivas y negativas en especial *S. aureus*, *V. cholerae* y *S. enterica*, lo que permite considerarla como un antibiótico de amplio espectro.

El efecto de *S. mexicana* sobre las curvas de crecimiento mostró tener un comportamiento bactericida al inhibir por completo a *V. cholerae* a las 2 horas de incubación con una concentración de 3 mg/mL.

El extracto acetónico, mostró la mayor actividad, por lo que sugiere que los metabolitos responsables de dicha actividad son de naturaleza polar.

Los extractos polares tuvieron mayor rendimiento, y se encontró que presentan metabolitos como fenoles, taninos, flavonoides y terpenos.

Los 3 extractos de *S. mexicana* presentaron actividad antifúngica, logrando una inhibición total de hasta 92.9% para el extracto acetónico con la cepa *T. mentagrophytes*.

Finalmente, el presente estudio contribuye a tener más información de la especie, ya que, aunque las propiedades biológicas de la familia Lamiaceae son muy estudiadas, la mayor relevancia está, en que existen poca información sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de *S. mexicana*, con lo que se contribuye a la línea de investigación resaltando la importancia de las plantas mexicanas y en particular *S. mexicana* que solo tiene uso ornamental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera C. (2020). Actividad Antimicrobiana de *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult Turneraceae). Tlalnepantla, Estado de México: FES Iztacala, UNAM.
2. Aguilera, E. (2016). Evaluación del Efecto Antitumoral de cuatro Extractos de la Herbolaria Mexicana en un Modelo Murino con Cáncer Inducido por Células TC-1 . Tlalnepantla, Estado de México: FES Iztacala, UNAM.
3. Aguilera, L. (1994). Contribución fitoquímica de *Salvia mexicana*. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: FES Cuautitlán, UNAM.
4. Bachir R. et al., (2015)
https://www.researchgate.net/publication/303310961_Antimicrobial_Activity_of_Extracts_from_Salvia_officinalis_L_on_some_Bacteria_and_Yeast
5. Bonifaz, A.. (2012). Micología Médica Básica. México D.F: Mc Graw Hill.
6. Cabral, L., Fernández, V., Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compound control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. International Journal of Food Microbiology 166: 1-14.
7. Calvo, J. & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 27 (1): 44-52.
8. Córdova, I., Othoniel H., Aragón M., Rubio I., Cabrera S., Nicolás A., Higuera S., Pozos A., Tely A., Castro S., Martínez F., Espinoza M. (2016). Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica 48 (3): 217-221.
9. Cornejo, G. (2011) Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. San José de la Huerta Morelia Michoacán. Revista Mexicana de Biodiversidad. 82: 1279-1296.
10. Coronado, K. (2019). Actividad antimicrobiana de *Echinopteryse glandulosa* (A. Juss) Small. Tlalnepantla, Estado de México: FES Iztacala, UNAM.
11. Díaz, P. (2017). Actividad antimicrobiana y antioxidante de *Echeverría gibbiflora* D.C (CRASSULACEAE). Tlalnepantla, Estado de México: FES Iztacala, UNAM.
12. Domínguez, X. A. (1979), Métodos de investigación fitoquímica. México: Ed. Limusa.

13. García, L. (2006). Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *S. aureus* con resistencia múltiple. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón Coahuila México. 124 p.
14. Ghezlbash, GH. R., Parishani M. R., Fouani M. H. (2015)
https://www.researchgate.net/publication/328135262_Antimicrobial_activity_of_Salvia_officinalis_acetone_extract_against_pathogenic_isolates/link/5c0bc6d592851c39ebdc8d23/
15. González, E. (2018). Actividad antimicrobiana de *Jefea pringlei* (Greenm). Strorher. Tlalnepantla, Estado de México: FES Iztacala, UNAM.
16. Hernández, D. (1999). Actividad antimicrobiana de la planta *Tagetes lucida* Cav. (Pericon). Tesis de Maestría. Tlalnepantla, Estado de México: FES Iztacala, UNAM.
17. Islas A. (2020). Identificación de los metabolitos secundarios y evaluación del efecto anticonceptivo de *Salvia fulgens*, *Salvia melissodora* y *Salvia wagneriana*. Ciudad Universitaria, CDMX. Facultad de Biología UNAM.
18. Islas, E. (2013). Determinación del perfil de compuestos bioactivos fenólicos y triterpénicos pentacíclicos en salvias mexicanas. Coyoacán, México Distrito Federal: Facultad de Química UNAM.
19. Jones, C., Hartley, S. (1999). A protein competition model of phenolical location, *Oikos* 86: (27-44).
20. Koneman, W. E. 1985. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México. 461 pp.
21. Kubo, Y. 1993. Antimicrobial activity of green tea flavor components. En bioactive volatile compounds from plants. Editores American Chemical Society. E. U. A.
22. López A. (2020). Aislamiento y determinación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Salvia longispicata*. Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Facultad de Química UNAM.
23. López, L. (2013) Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Medellín Colombia. *Actual Biol.* 35 (98): 77-83.

24. Martínez, A. (2010). Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: Volvocales) Cultivada en diferentes medios. México, Distrito Federal: Instituto Politécnico Nacional.
25. Medina, J. (1998). Determinación de la actividad antibacteriana y estudio de la relación estructura- actividad de diterpenos aislados de *Salvias* mexicanas. Coyoacán, México, Distrito Federal: Facultad de Química UNAM.
26. Moreno, L. (2019). Aislamiento, determinación estructural y evaluación de la actividad biológica de metabolitos secundarios provenientes de *Salvia axillaris*. Ciudad universitaria Coyoacán CDMX: Facultad de Química UNAM.
27. Mounyr B., Moulay S., Wessal O. Abdeliah F., Soumya E., Saad I.(2014). Antibacterial activity of extracts from *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* obtained by sonication and maceracition methods. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6, 2-4.
28. OMS. (2020). Cólera. 02- marzo- 2020, de OMS Sitio web: <https://www.who.int/topics/cholera/es/>
29. OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud.
30. OMS. (2020). Salmonelosis. 02- marzo- 2020, de OMS Sitio web: <https://www.who.int/topics/cholera/es/>
31. OMS. (2020). Resistencia a los antibióticos 02- marzo- 2020, de OMS Sitio web: <https://www.who.int/topics/cholera/es/>
32. Peña, M. (2017) Evaluación del método del cloruro de yodo nitro tetrazolio (INT) a formazán para estimar la respiración de bacterias en comunidades marinas. Ensenada, Baja California, México. CICESE.
- 33 Pérez, L. (2016). Actividad antimicrobiana de *Cnidoscopus tehuacanensis* Beckron. Tlalnepantla, Estado de México: FES Iztacala, UNAM.
34. Ríos, G.. (2018). Estudio in vitro de la actividad antifúngica de los extractos de *Salvia sessei*. Ciudad Universitaria, CDMX.: Facultad de Ciencias UNAM.

35. Ríos M. (1987). Aislamiento y determinación estructural de los metabolitos secundarios presentes en *Salvia longistyla* (LABIATAE) y *Chrysactinnia mexicana* (COMPOSITAE). México D.F.: Facultad de Química UNAM.
36. Rivas, C. Oranday, M. Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Nuevo León, México: OmniaScience.
37. Robles-García, M.A.A. J., Gutierrez- Lomeli, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J, A., Guerrero-Medina, p. J., Madrigal-Pulido, J. A. y Del-Toro-Sánchez, C.L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxy lumcapriri* Pittier). Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, XVIII (3): 3-8.
38. Serra, C. (2018). Efecto del acondicionamiento de las semillas de *Salvia mexicana* sobre el crecimiento y supervivencia de sus plántulas en bordes de avanzada del Parque Ecológico de la Ciudad de México. Coyoacán, México Distrito Federal: Facultad de Ciencias, UNAM.
39. Sharapin, N., R. Machado, C. Souza, L. Rocha de Albuquerque., S. Macedo y A. López. 2000 Fundamentos de tecnología de productos fito terapéuticos. Área de Ciencia y Tecnología del Convenio Andrés Bello y Red Iberoamérica de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO) del Subprograma X del CITED. Colombia. 41- 45
40. Struthers, K.J.y Westran. R. P. 2005. Bacteriología clínica. Masson. España 49-56.
41. Wang, H. Y Bun, T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry. 61:1-6.

APÉNDICES

✚ APÉNDICE 1. Descripción de la planta *S. mexicana* (Serra, 2018)



Figura 10. Individuo adulto de *S. mexicana* (Serra, 2018)

Salvia mexicana es una dicotiledónea de la familia Lamiaceae, planta herbácea perenne o arbusta que mide de 50 cm a 3 m de altura, de tallo pubescente y hojas opuestas de forma ovalada que miden entre 6 y 8 cm de largo y de 2.5 a 12 cm de ancho. Sus flores están dispuestas en verticilos formando espigas y el número de flores en estas inflorescencias racemosas es muy variado. Presentan brácteas ovadas de 0.6 a 1.2 cm de largo y de 3 a 5 mm de ancho. El cáliz de 0.8 a 1.7 cm de largo, y de 3 a 8 mm de ancho, pubescente a lo largo de las nervaduras. La corola es morada de 2.4 a 4.3 cm de largo y 5 mm de ancho pilosa en general. Las flores son monoicas y tienen dos estambres y un ovario con cuatro carpelos que generarán solo una semilla cada uno. Tienen un nectario en la parte basal de la corola cerca del ovario (Serra 2018).



Figura 11. Acercamiento de la flor de *S. mexicana* (Cornejo et al., 2011)

Las flores son de color azul púrpura con no más de 4 cm de longitud. El periodo de floración se extiende de agosto a noviembre, las flores duran un periodo de 4 días. Es una planta auto compatible en la que el entrecruzamiento representa una parte importante del desempeño reproductivo. La polinización para esta especie ha sido asociada con la abeja *Deltoptila elevas* en cinco localidades de México y con cinco especies de colibríes en el oeste de México.

Salvia es el género más diverso de la familia Lamiaceae, con cerca de 1000 especies distribuidas alrededor del mundo. México es considerado como una de las áreas con mayor diversidad del género en el mundo, con aproximadamente 300 especies que en un porcentaje importante (85-88%) son endémicas.

La mayor diversidad de especies del género *Salvia* se presenta en las zonas montañosas de México principalmente en las del centro-sur del país. En consecuencia, los bosques templados y en particular los de coníferas y encinares, son los tipos de vegetación que albergan la mayor proporción de especies de *Salvia*. No obstante, también las podemos encontrar en bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, zonas áridas y desérticas (Cornejo 2011).

✚ APÉNDICE 2. Extracción mediante maceración y concentración a presión reducida (Sharapin et al.,2000).

La maceración es una técnica de extracción de compuestos dependiente de la polaridad; Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la planta y el solvente en los que intervienen factores como su naturaleza, tamaño de partícula etc. Consiste en dejar reposar la materia orgánica previamente fragmentada o pulverizada en un disolvente de elección de diferentes polaridades (hexano, metanol, agua, acetato de etilo, acetona etc.) durante un tiempo determinado. Existen diversas metodologías para llevar a cabo esta técnica, dentro de las cuales se encuentra la extracción directa y la sucesiva. La directa consiste en dividir la materia orgánica en 3 fracciones iguales y adicionar el disolvente por separado, es decir, un matraz con materia orgánica para cada disolvente, dejándose reposar el tiempo indicado y realizándose 3 veces para obtener mayor superficie de contacto y de esta manera obtener más rendimiento. En la extracción sucesiva se agrega a la materia orgánica primeramente el solvente de menor polaridad, una vez dejando reposar el tiempo indicado se retira el disolvente de la materia orgánica y se le agrega el siguiente disolvente de manera que la polaridad vaya en ascenso.

Una vez realizada la maceración se prosigue a realizar una destilación y condensación con vacío mediante un rotavapor, que permite la evaporación y separación rápida del disolvente de la disolución, obteniendo de esta manera el extracto seco. Esto es gracias a que el rotavapor utiliza energía mecánica, calor y vacío, que disminuyen el punto de ebullición del disolvente, condiciones que permiten que el disolvente se evapore más rápido que en condiciones normales y logrando una menor degradación y volatilización de los compuestos presentes en el extracto.

✚ APÉNDICE 3. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE Kirby-Bauer (Koneman et al., 1985).

Este método fue diseñado para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de cualquier sustancia a probar, como extractos de una planta, compuestos químicos, aceites esenciales, fármacos etc.

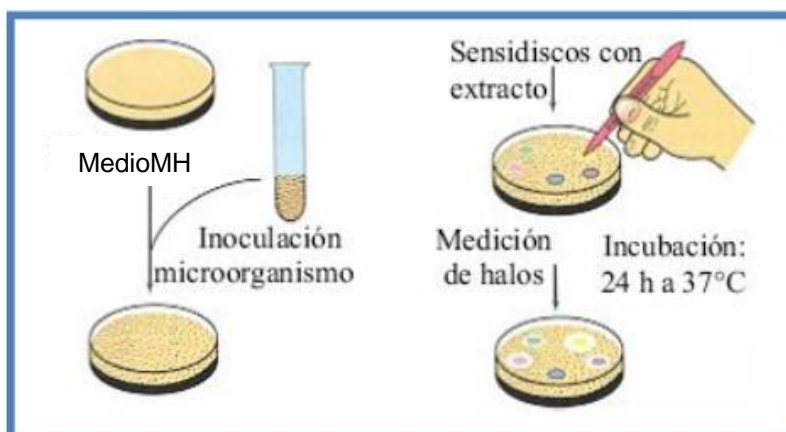


Figura 12. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer (Martínez 2010).

- Preparación de discos

La metodología en general consta de impregnar sensidiscos de celulosa previamente estériles con una concentración de la sustancia a evaluar, utilizando también un antibiótico específico como control (Este evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con un antibiótico sintético).

- Medio de cultivo

En este experimento se utilizan placas de agar Müller- Hinton que es un cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano proporcionando resultados confiables y reproducibles. Éste medio de cultivo debe de alcanzar un espesor uniforme de 4 mm, ya que si es más fino los compuestos tienden a difundirse en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición y dando resultados no confiables.

- Suspensión del agente microbiano

Las placas deben ser inoculadas previamente con el microorganismo a evaluar, mediante la preparación de una suspensión que se realiza en un cultivo líquido (caldo MH), utilizando de 3 a 5 colonias aisladas, estas se adicionan a 10 mL de caldo dejándose incubar de 18 a 24 horas a 37°C, esperando que la turbidez corresponda al No. 5 de McFarland (1.5×10^8 UFC/MI).

- Inoculación de las placas

Pasado el tiempo de incubación se prosigue a sembrar en las cajas de agar de Müeller- Hinton utilizando un hisopo de algodón estéril se sumerge en el inóculo se retira el exceso y se siembra masivamente en toda la superficie del agar, (cabe destacar que no importa la cantidad que tome el hisopo, puesto que es una prueba cualitativa).

- Aplicación de los discos

Posteriormente se colocan los sensidiscos previamente impregnados de la sustancia a evaluar, procurando que queden uniformemente separados (no más de 6 discos por caja).

- Incubación y lectura de las cajas

Por último las cajas previamente sembradas y con los discos se meten a incubar durante 24 horas a 37°C sin mayor tensión de CO₂ ya que el CO₂ puede formar ácido carbónico en la superficie húmeda del agar, provocando un descenso en el pH (El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual puede provocar una estrechez en la inhibición). A medida que las bacterias se multiplican durante la incubación, el antibiótico y la sustancia a evaluar si tiene propiedades inhibitorias se irá difundiendo alrededor de cada sensidisco el cual puede observarse como un halo transparente proporcional a la susceptibilidad del microorganismo, lo que significa que si se observa fenómeno es porque la sustancia a evaluar tiene propiedades inhibitorias.

- Resultados

Finalmente se miden las zonas de inhibición con Vernier, reportando los valores obtenidos en mm.

✚ APÉNDICE 4. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)
(Koneman et al., 1985).

La concentración mínima inhibitoria es uno de los parámetros más importantes para determinar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibiótico. Esta técnica se realiza introduciendo en placas de ELISA varias concentraciones diluidas, de modo que cada uno de los pozos tenga una concentración diferente de la sustancia a evaluar. Tras realizar una incubación, se determina la CMI comprobando el crecimiento de las bacterias en cada uno de los tubos indicado por la turbidez en su interior es decir, se mide la mínima concentración en la que se observa una disminución drástica del crecimiento bacteriano. Mientras que la CBM considera la concentración donde no se observa crecimiento, es decir la concentración a la cual el extracto permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original.

- Alícuotas del extracto

Para este bioensayo se evalúan diferentes concentraciones del extracto desde 0, hasta 3.0 µg/mL) según sea conveniente. Para ello se prepara una solución patrón que adicionalmente dependiendo de la solubilidad del extracto contiene 1% del tensoactivo Tween, que es una molécula anfifílica no aniónica que contiene una parte hidrofóbica y una hidrofílica, lo que ayuda a la formación de micelas para aumentar la solubilidad. Con base en ésta se toman las alícuotas correspondientes para las diferentes concentraciones, posteriormente cada alícuota se agrega a una cantidad de caldo MH establecido, con la finalidad de obtener las concentraciones señaladas. Una vez realizadas las alícuotas se agitan para tener una dispersión homogénea y se colocan 50 µL en cada pozo de las placas.

- Inóculo

Se realiza un inóculo que consiste en una dispersión bacteriana con una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL. Se realiza agregando 3 a 4 colonias aisladas a 10 mL de caldo MH y se incuba durante 35°C durante 24 horas. Posteriormente se toman 0.1 mL y se adicionan a 10 mL de caldo obteniendo así

una concentración de bacterias de 10^5 UFC/mL. Finalmente se adiciona el inóculo con la ayuda de una micropipeta tomando 50 μ L y colocándolos sobre los pozos de las placas que ya contienen las diferentes concentraciones del extracto. Esta placa se cubre y se lleva a incubar durante 24 horas a 37°C.

- Control negativo

Como control negativo se colocan únicamente 50 μ L de caldo MH.

- Control positivo

Como control positivo se colocan 50 μ L de cloranfenicol con la suspensión bacteriana.

- Cuantificación de la viabilidad bacteriana

Pasado el tiempo de incubación se añade a cada pozo 50 μ L de una solución de 0.08% de cloruro de tetrazolio oxidada (TTC) y se incuba durante 30 min a 37°C. Esta técnica se basa en cuantificar la actividad metabólica de los microorganismos como una medida de la viabilidad bacteriana. El uso de esta sal ayuda a medir la actividad respiratoria de la bacteria ya que este compuesto compite en la célula como aceptor de electrones con el oxígeno en la cadena respiratoria. Por lo tanto, si la bacteria es metabólicamente activa el sistema de transporte de electrones reduce al TTC formando un compuesto conocido como formazán ya que por su propiedad de tener un anillo central con carga positiva y átomos de nitrógeno, al ser reducido provoca que el anillo se rompa formando una coloración rojiza.

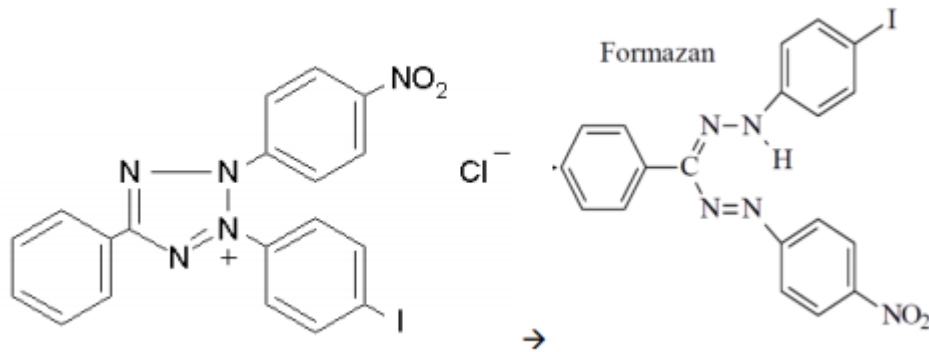


Figura 13. Sal de tetrazolio reducida a Formazán (Peña, 2017).

Por lo tanto, en los pozos donde se desarrolle una coloración rojiza significará que hubo desarrollo bacteriano, donde no haya desarrollo la solución permanecerá incolora.

✚ APÉNDICE 5. MÉTODO CUALITATIVO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL DE HONGOS (Wang y Bun, 2002).

Para evaluar cualitativamente la actividad del extracto frente a hongos filamentosos se realiza la técnica de inhibición del crecimiento radial, la cual consiste en observar si el extracto inhibe el crecimiento del hongo observando como resultado, un crecimiento más lento o detenido, resultando en la deformación de la colonia.

Para realizar esta prueba la metodología es la siguiente:

- Placa de agar

El método se lleva a cabo en placas de agar sólido papa- dextrosa (PDA) utilizando 20 mL en el cual posteriormente se inocula el micelio del hongo.

- Sensidiscos

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro impregnados con 2 mg/L de extracto y como control se utiliza ketoconazol. Los sensidiscos son previamente preparados 24 horas antes del bioensayo.

- Hongos levaduriformes

Se utiliza la misma técnica previamente descrita para las bacterias utilizando agar PDA y nistatina como control positivo. (**Apéndice 3**).

- Metodología para hongos miceliados

Se coloca el micelio en la parte central del agar posteriormente se posicionan los sensidiscos a 5 mm del límite micelial, utilizando una pinza estéril. Cabe mencionar que estos estudios se realizan por triplicado para obtener reproducibilidad en los resultados.

- Incubación.

Las cajas se incuban a 23 °C durante 72 horas o hasta que el micelio se desarrolle completamente.

- Control positivo.

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de ketoconazol o nistatina.

- Control negativo.

Para descartar alguna contaminación se utilizan discos impregnados con disolvente.

✚ APÉNDICE 6. MÉTODO CUANTITATIVO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL DE HONGOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MEDIA (CF₅₀) (Wang y Bun, 2002)

El método se lleva a cabo en placas de 12 pozos con 50 µL de agar PDA, en las cuales se colocan diferentes concentraciones de extracto (0.0 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL) según sea conveniente.

- Metodología

Las placas de 12 pozos tendrán 1.5 mL de agar PDA y diferentes concentraciones de extracto. Posteriormente se coloca el hongo justo en el centro de los pozos y se incuban a 28°C de 24 a 72 horas o hasta que el micelio del hongo crezca.

El experimento se realiza por triplicado.

- Control positivo.

La sensibilidad de las cepas se evalúa con Ketoconazol a las concentraciones predeterminadas

- Control Negativo

Se utiliza una placa con el hongo y sin extracto para comparar la velocidad del crecimiento.

- Resultados e Interpretación

Para leer los resultados se espera hasta que el control negativo crezca en todo el pozo. Para interpretar los resultados se mide el crecimiento del hongo y se realiza una gráfica dosis-respuesta, en la que la respuesta es el porcentaje de inhibición, tomando en cuenta que el grupo testigo es el 0% de inhibición. Posteriormente se realiza una regresión lineal y se despeja de la ecuación el valor de la CF₅₀.

✚ APÉNDICE 7. CURVA LETAL (CURVA DE SUPERVIVENCIA Y EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO) (Kubo et al., 1993)

Los antibióticos son sustancias que nos ayudan a eliminar una infección bacteriana cuando llegamos a padecer alguna enfermedad, estos deben de ser eficaces y seguros, por lo que la concentración debe ser una o varias veces superior a la CMI, sin embargo, no tiene que ser tan elevada como para causar toxicidad en el paciente. (Struthers y Westran, 2005)

Este método permite determinar el efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano en base a la CMI y a la CBM.

- Alícuotas del extracto

Para esta técnica primero se debe preparar un tubo con una concentración stock del extracto, a partir del cual se realizarán las alícuotas de diferentes concentraciones. Una vez establecidas las cantidades, serán colocadas en 4 tubos con 1.5 mL de medio BHI.

- Inóculo

Posteriormente se realiza un inóculo inicial de 1.5×10^8 UFC/mL en un tubo con 10 mL de caldo MH, además de 4 tubos con caldo MH para las concentraciones $\frac{1}{2}$ CMI, CMI CBM y el testigo. También se preparan tubos con solución salina al 0.08% para las posteriores diluciones.

A partir de este inóculo se deben colocar 10 μ L en un tubo de 10mL con solución salina equivalente a una concentración de 1.5×10^5 UFC/mL; de este último se colocarán 12 μ L en cada uno de los 4 tubos que contienen el caldo BHI con las concentraciones del extracto. Los tubos se deben incubar durante todo el experimento en una estufa sin presión de CO₂ a 37°C.

- Muestreo

Se muestrea cada dos horas (T_0-0 , T_1-2 , T_2-4 , T_3-6 , T_4-8 , T_5-12 , T_6-24)(Tiempo-horas transcurridas), tomando de cada tubo 50 μ L y se colocan en viales con 5 mL de solución salina, dependiendo de la turbidez y el crecimiento del microorganismo. Posteriormente se deben colocar 50 μ L del mismo vial en cada septo correspondientemente a la concentración dentro de las cajas y se deberá extender en el agar con una varilla de vidrio, Las cajas se deben de incubar a 37°C.

- Diluciones

Cuando crecen abundantes colonias y no es posible contarlas se realiza un factor de dilución, el cual nos ayuda y facilita la obtención de resultados ya que al estar más diluido se obtendrán menos colonias que podrán ser contadas, posteriormente únicamente se realiza una multiplicación de las colonias contadas por el factor de dilución y se obtienen los mismos resultados.

Para determinar las UFC/mL en cada tiempo, se realizan dos diluciones de cada concentración en solución salina estéril y se siembran en placas con agar para permitir su crecimiento. Estas se incuban durante 24 horas a 37°C.

- Interpretación de resultados

Pasado el tiempo de incubación se procede a contabilizar las colonias obtenidas, posteriormente se grafica el Logaritmo de las UFC contra el tiempo y se observa la tendencia. Finalmente se realiza una extrapolación de la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

✚ APÉNDICE 8. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS (DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS) (Domínguez, 1979; Robles-García et al., 2016)

Tabla 14. Metodología y reactivos para la detección de metabolitos secundarios:

Grupo de MS	Reactivos	Metodología	Prueba positiva
Fenoles	FeCl ₃	Mezclar 1 mL de solución patrón y 3 gotas de FeCl ₃	Coloración azul verde
Taninos	Reactivo de gelatina	Mezclar la solución del tubo con prueba positiva de fenoles y 3 gotas del reactivo de gelatina (1%)	Precipitado azul o verde oscuros
Alcaloides	Dragendorff	Mezclar 1 mL de solución patrón y 3 gotas de reactivo de Dragendorff	Precipitado rojizo
Alcaloides (confirmatoria)	Mayer	Mezclar 1 mL de solución patrón y 3 gotas de reactivo de Mayer	Precipitado lechoso
Glucósidos	α-naftol y HCl	Mezclar 1 mL de solución patrón, 3 gotas de α-naftol y 3 de HCl (este debe dejarse caer por la paredes)	Anillo morado
Saponinas	Agua destilada	Agitar 10 mg de extracto con 2 mL de agua destilada por al menos dos minutos	Espuma que permanece mínimo por un minuto.
Flavonoides y cumarinas	NaOH y HCl	Mezclar 1 mL de NaOH al 10% y 5 gotas de sol. patrón	1) Si hay coloración amarilla la prueba es positiva para flavonoides.

			2) Agregar 3 gotas de HCl al 10%. Si la mezcla se vuelve transparente la prueba es positiva para cumarinas.
Triterpenos y esteroides	Lieberman- Buchard	Disolver 2 mg de extracto con 1mL de cloroformo, mezclar con 3 gotas de reactivo de Lieberman-Buchard	1) Color azul o verde: positivo para esteroides. 2) Color rojo, violeta o morado: positivo para triterpenos.
Terpenos	Vainillina-H ₂ SO ₄	Realizar una cromatografía en capa fina (CCF) Aplicar el extracto en la placa y utilizar como fase móvil una mezcla de tolueno- acetato de etilo (93:7). Revelar la placa 1) Adicionar por aspersion vainillina (5%) y dejar secar 2) Adicionar por aspersion H ₂ SO ₄ (5%) y dejar secar 3) Calentar la placa en una parrilla a temperatura baja.	1) Prueba positiva: marcas de colores azul, verde, rojo, morado, rosa o naranja. 2) Prueba negativa: marcas de color gris
