



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Waltheria americana*.

TESIS

QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE **BIÓLOGA**

MEDINA MONTIEL AMÉRICA SARAHÍ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por permitirme ingresar a su casa de estudios, en la cual adquirí las mejores enseñanzas de grandes profesores.

A la FESI, que me regaló momentos inolvidables, tanto académicos como personales.

A la Dra. Claudia Tzasna, por apoyarme y motivarme a continuar con esta modalidad de titulación, por confiar y regalarme su tiempo. Gracias por sus enseñanzas y su paciencia.

A la Dra. Rocío Serrano por ser tan paciente en cada experimento, por su guía, apoyo y motivación que me proporciono todos los días en el laboratorio.

Al Dr. José Guillermo Ávila por su dedicación y pasión a la ciencia, por el método tan particular que tiene para compartir su conocimiento y por regalarnos clases tan divertidas y llenas de muchas enseñanzas.

A la Dra. Julieta Orozco por su gran paciencia para solucionar todos los problemas y dudas que se me presentaban.

A la Dra. Montserrat Espinosa por su interés y aportaciones hacía mi trabajo.

A todo el equipo de laboratorio de Farmacognosia por su interés y guía en todo el periodo que estuve, nunca faltaron las risas y el apoyo. Todo mi respeto y admiración.

DEDICATORIAS

A mis padres que siempre están apoyándome en todo, no importa los tiempos difíciles que estemos pasando, siempre tienen un sí para las locuras que decido hacer. Gracias por sus enseñanzas, por los consejos, regaños y risas que me han dado, para mí, son mi mayor ejemplo. Aquí tienen lo que tanto prometí; tal vez me tardé en entregarlo pero bien dicen que, más vale tarde que nunca. Gracias por el cariño y amor que me demuestran a diario. GRACIAS por nunca dejar de confiar en mí. Los quiero mucho.

A Ramses (mi hermano), gracias por todo tu apoyo, por estar cuando te necesitaba. Porque a pesar de la distancia siempre tuviste tiempo para apoyarme, aconsejarme y enseñarme. Eres un GRAN ejemplo para mí, y estoy segura que eres un gran ejemplo para tus hijos. Aprovecho para dar las gracias a Lenny, Sury y Janeth, por el apoyo y cariño que me han demostrado. Los quiero mucho.

A Ana (mi hermana), gracias por todo tu apoyo, siempre estuviste cuando más lo necesitaba. Eres un GRAN ejemplo a seguir. Siempre fuiste mi guía, cómplice y mi mejor amiga. Gracias por escucharme y darme consejos, por querer hacerme tan fuerte como tú lo eres. Muchas gracias por todo tu tiempo y la confianza que me das. Aprovecho para agradecer a Edu, por su apoyo y siempre estar acompañándonos en los momentos buenos y no tan buenos. Los quiero mucho.

A Paola Dailey, gracias por tu apoyo incondicional, por enseñarme que la distancia no es un impedimento. Gracias por tu cariño, amor, paciencia, consejos y enseñanzas. Gracias por tu tiempo, por convertirte en mi mejor amiga, por confiar en mí y por hacerme más segura. Gracias por tanto en tan poco tiempo. Te quiero mucho.

A todas mis amigas, por regalarme momentos inolvidables, por hacer el tiempo más ameno, siempre recordaré las alegrías y tristezas que vivimos durante este tiempo. Gracias niñas. Las quiero.

Índice general

Resumen		1
Introducción		2
Antecedentes		6
Objetivos		7
	Objetivo general	
	Objetivos particulares	
Área de colecta		8
Metodología		9
Análisis estadísticos		11
Resultados y análisis		12
Discusión		19
Conclusiones		23
Apéndice I	<i>Waltheria americana</i>	24
Apéndice II	Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer	26
Apéndice III	Técnica de dilución en agar	29
Apéndice IV	Curva de sobrevivencia	31
Apéndice V	Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar	32
Apéndice VI	Determinación de la concentración fungicida media (CF ₅₀) y la concentración fungicida mínima (CFM)	33
Apéndice VII	Caracterización Fitoquímica por métodos colorimétricos de los extractos	34
Bibliografía		35

Índice de cuadros

Cuadro 1	Datos etnobotánicos de <i>W. americana</i> .	12
Cuadro 2	Rendimiento de los extractos de <i>W. americana</i> .	12
Cuadro 3	Actividad antibacteriana cuantitativa de los diferentes extractos de <i>W. americana</i> .	14
Cuadro 4	Actividad antifúngica de los extractos de <i>W. americana</i> .	17
Cuadro 5	Caracterización fitoquímica de <i>W. americana</i> .	19

Índice de figuras

Figura 1	Actividad antibacteriana cualitativa de los extractos de <i>W. americana</i>	13
Figura 2	Efecto del extracto acetato de etilo de <i>W. americana</i> sobre la curva de crecimiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Figura 3	Efecto del extracto metanólico de <i>W. americana</i> sobre la curva de crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> .	15
Figura 4	Efecto del extracto metanólico de <i>W. americana</i> sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	1
Figura 5	Efecto del extracto metanólico de <i>W. americana</i> sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> .	17
Figura 6	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto de acetato de etilo de <i>W. americana</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> .	18
Figura 7	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de <i>W. americana</i> sobre <i>A. niger</i> .	18

Resumen

W. americana es conocida como cenizo, pertenece a la familia Sterculiaceae. Es utilizada en la medicina tradicional como antidiarreico, desinflamatorio, analgésicos y antiséptico. En estudios previos de la especie se ha reportado efecto analgésico y antiinflamatorio sin embargo no se ha estudiado el efecto antimicrobiano. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de *W. americana*. Se colectó en Santiago Quiotepec, municipio de Cuicatlán, Oaxaca; con número de colecta JOM030. Los extractos se obtuvieron por medio de maceración con hexano, acetato de etilo y metanol. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos se determinó en 20 cepas bacterianas, tres cepas de hongos levaduriformes y cuatro miceliados. Los métodos utilizados fueron; difusión en agar Kirby-Baüer, inhibición del crecimiento radial y dilución en agar, curva de sobrevivencia y caracterización fitoquímica cualitativa. El extracto activo fue: el metanólico, inhibiendo el crecimiento de seis cepas bacterias Gram positivas y una Gram negativa. En las curvas de sobrevivencia los extractos de acetato de etilo y metanólico presentaron un efecto bactericida sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. aureus* cc y *S. epidermidis* ATCC 12228 después de doce horas de someter a los microorganismos al extracto en las concentraciones de 9 mg/mL. En la evaluación de la actividad antifúngica *A. niger* fue la cepa más susceptible al extracto acetato de etilo y metanólico ($CF_{50}=1.32$ y 1.21 mg/mL respectivamente). En la caracterización fitoquímica se detectaron fenoles, taninos, glucósidos, cumarinas y esteroides en el extracto acetato de etilo y metanólico. Por lo tanto se valida el uso de *W. americana* en la medicina tradicional.

Palabras clave: Medicina tradicional, actividad antibacteriana y *Waltheria americana*.

Introducción

La medicina tradicional forma parte del patrimonio cultural de la humanidad, y se ha desarrollado en diversos países con características propias, dependiendo de los recursos disponibles y esto ha sido el resultado de una evolución lenta, pero avalada por la experiencia práctica. El empleo de las plantas para la alimentación del hombre y la curación de diversas enfermedades, se remonta a unos 2 millones de años, ésta es la forma más antigua de atención médica que se ha conocido en la humanidad (Chifa, 2010).

Actualmente la medicina tradicional es un componente importante para los servicios de salud, suele practicarse cotidianamente y según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2002, la demanda de estos servicios va en aumento. Para la OMS la medicina tradicional es considerada como la suma de conocimientos teóricos y prácticos, los cuales son utilizados para el diagnóstico, prevención y supresión de trastornos físicos, mentales o sociales, basados en la experiencia y la observación, y éstos son transmitidos verbalmente o por escrito de una generación a otra (OMS, 1978).

Según la OMS entre el 66% y 85% de la población mundial recurre a la herbolaria para atender diversos padecimientos y enfermedades (Villavicencio y Pérez, 1995). Es una costumbre ancestral que ha sido utilizada hasta la época actual (Martinez y Marinoff, 2008). Las personas con el conocimiento sobre la medicina tradicional viven y trabajan en comunidades indígenas, ya que en muchas ocasiones es el único recurso terapéutico de estas localidades y grupos étnicos (OMS, 2002).

En América Latina, especialmente en México la medicina tradicional representa una opción importante de respuesta ante las necesidades de atención a la salud y esto gracias a la herencia cultural, pero a su vez ha ido contribuyendo a la medicina moderna, permitiendo realizar diversas investigaciones como el aislamiento de los principios activos de la parte de la planta que tiene efectos

terapéuticos y han contribuido al tratamiento de diversas enfermedades causadas por bacterias y hongos (Nigenda *et al.*, 2001).

Las bacterias son células procarióticas sin núcleo definido, tienen una estructura sencilla en comparación con las células eucariotas; sus formas y tamaños son variados. Algunas bacterias forman endosporas resistentes para sobrevivir en ambientes extremos en estado de reposo. De acuerdo a su forma las bacterias pueden ser bacilos, cocos y espirilos. Carecen de sistemas de membranas internas y en el citoplasma se localizan los cuerpos de inclusión, los ribosomas y el nucleóide con el material genético. Poseen una membrana plasmática y una pared celular compleja que contiene péptidoglicanos, éstos les protege frente a sustancias tóxicas por lo que es el blanco de acción de varios antibióticos (Schulz *et al.*, 1999).

Las bacterias se clasifican en gram-positivas y gram-negativas, en función de la pared celular y la respuesta a la tinción con el reactivo de Gram. La pared de una bacteria gram-negativa es compleja, posee una capa de péptidoglicanos que rodea la membrana plasmática y una membrana externa, mientras que la pared de las bacterias gram-positivas está formada por una capa de péptidoglicanos separada de la membrana plasmática por el espacio periplásmico (Kong *et al.*, 2010).

Los hongos son organismos eucariotas, las células de los hongos se diferencian de las de las plantas en la composición de la pared celular, en la carencia de cloroplastos y clorofila; y de las humanas en que tienen pared celular y en la presencia de ergosterol en la membrana citoplásmica. En el exterior de la membrana citoplásmica, presentan una pared celular que está compuesta fundamentalmente por polisacáridos y por diversas proteínas. Los polisacáridos más importantes son la quitina, el manano y el glucano. Los hongos presentan dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme (Bial-Aristegui, 2002).

Los hongos filamentosos representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos en medios de cultivo sólido y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen; por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. Presentan unas estructuras tubulares, formadas por múltiples células, que se denominan hifas, éstas normalmente se desarrollan a partir de esporas (Bial-Aristegui, 2002).

Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas. Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales denominadas levaduras. Los hongos levaduriformes se dividen por gemación o por fisión binaria (Bial-Aristegui, 2002).

Estos organismos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimio heterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedero (Bial-Aristegui, 2002).

Tradicionalmente, las plantas medicinales se usan como fuentes de tratamiento de enfermedades (Holetz *et al.*, 2002); ya que los principios activos que se obtienen de éstas, proceden de una enorme cantidad de compuestos llamados metabolitos secundarios (MS) (Soto, 2011).

Los MS son moléculas activas generadas por especies vegetales que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de la planta, pero cumplen con funciones muy importantes como: defensivas contra insectos, bacterias y hongos. Comúnmente las mayores concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentran en hojas, flores y semillas (Soto, 2011).

México en el ámbito mundial, con respecto al número de especies de plantas, ocupa el quinto lugar en diversidad biológica y se estiman alrededor de 7,000 especies con algún tipo de uso, se han registrado 4,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total mundial); entre 3,500 a 4,000 son empleadas por la población mexicana; 3,600 se recolectan de forma silvestre; 1,500 son utilizadas regularmente sin procesar y 35 especies se encuentran amenazadas por factores externos. (Ocegueda *et al.*, 2005).

Dentro de las especies con atributos medicinales se encuentra *Waltheria americana* perteneciente a la familia Sterculiaceae, la cual posee características herbáceas, generalmente cubierta de pelos suaves en hojas y tallos (Baudillo, 2008). La planta florece después de los seis meses de crecimiento y lo realiza continuamente hasta su muerte. Sus flores son amarillas y su reproducción está asegurada por semillas (Saunders, 2011), aunque pueden ser polinizadas por abejas o avispas (João y Martins, 1998). Se localiza en todos los trópicos y subtropicales más cálidos. La especie es nativa del Nuevo Mundo donde se produce desde Florida y Texas a Brasil. La planta se ha utilizado como una infusión o decocción, la cual puede alcanzar una gran concentración de sustancias activas, por lo que se busca encontrar una acción febrífuga, purgativa, desinflamatorio, analgésica y astringente (Burkill, 2000)(Apéndice I).

Antecedentes

Se han realizado diversos estudios de acerca de la composición química del género *Waltheria*.

Gressler y colaboradores en 2008, aisló tres flavonoides de la planta completa de *W. douradinha* los cuales inhiben la producción de mediadores inflamatorios como el óxido nítrico, interleucina 12 y factor de necrosis tumoral.

Olajuyigbe y colaboradores en 2011 realizaron extractos de etanol de hojas, tallos y raíces de *W. indica* localizada en Nigeria, obteniendo como resultado inhibición de cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas. En el análisis cualitativo fitoquímico de las diferentes partes de la planta indicó la presencia de saponinas, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, taninos, fenoles y glucósidos.

Zongo y colaboradores en 2013 realizaron una recopilación de *W. americana* en distintas fuentes de información y obtuvieron como resultado que estudios en extractos crudos (planta entera o de una parte) y compuestos (5,2',5'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona y 5,2'-dihidroxi-3,7,4',5'-tetrametoxiflavona) mostraron actividad analgésica, antiinflamatoria, antibacteriana, antimicótica, antipalúdica, antianémica, antioxidante, sedante y anticonvulsiva. Las investigaciones fitoquímicas mostraron la presencia de alcaloides, ciclopéptidos, flavonoides, taninos, terpenos, saponinas y antraquinonas. También realizaron estudios de toxicidad aguda en ratones, indicando que puede ser tóxica a una concentración DL_{50} de 500 mg/Kg.

Loaiza en 2014 realizó un estudio donde utilizó extractos acuosos e hidroetanólicos de *W. americana* obtenidos de hojas, tallos y ramas, para probar si presentaban actividad antiviral durante el ciclo de replicación de rotavirus en células MA 104. Obteniendo como resultado que los extractos acuosos e hidroetanólicos son capaces de reducir desde un 60-100% la producción de focos infecciosos de rotavirus humano sobre células MA 104 al agregarse antes e incluso después de la infección viral.

Justificación

La planta *W. americana* es utilizada en la medicina tradicional por comunidades indígenas para el tratamiento de distintas enfermedades como la diarrea, la disentería y los trastornos pulmonares. No existe evidencia científica que apoye la importancia etnomedicinal de esta planta en el tratamiento de dichas enfermedades, por tanto es importante validar su uso y contribuir al conocimiento de esta especie.

Hipótesis

Como ya se ha reportado que *W. americana* recolectada en África sintetiza diversos metabolitos secundarios, los cuales han presentado actividad analgésica, antiinflamatoria, antibacteriana, entre otras; por lo que es probable que la misma especie, pero colectada en San Juan Quiotepec, Oaxaca presente actividad antimicrobiana.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana de *W. americana*.

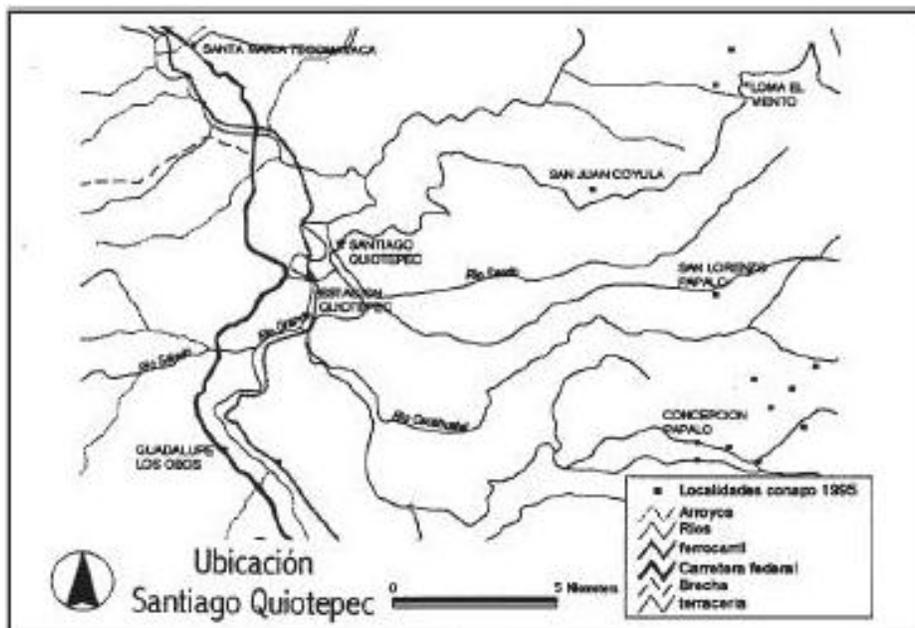
Objetivos particulares

- Obtener extractos de diferentes polaridades de *W. americana* y determinar su rendimiento.
- Evaluar la actividad antimicrobiana cualitativa en cepas de importancia clínica.
- Evaluar la actividad antimicrobiana cuantitativa: MIC, CBM, CFM y CF50.
- Evaluar el efecto de los extractos sobre la curva bacteriana de crecimiento.
- Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios.

Área de colecta

La comunidad de Santiago Quiotepec está situado en el municipio de San Juan Bautista en Cuicatlán Oaxaca. Se encuentra en el interior de la Sierra Madre Occidental a una altitud de 545 metros sobre el nivel del mar. Se considera un clima semiárido, muy seco, ya que recibe un promedio anual de precipitación pluvial de 500 mm. La temperatura promedio supera los 25°C alcanzando temperaturas en verano hasta de 36°C. Las lluvias se presentan durante los meses de junio a septiembre (Brunel, 2008).

A pesar del tipo de clima que presenta, se distingue por ser una comunidad con un potencial hídrico favorable, esto se debe a que se localiza a la orilla de cuatro ríos (Mapa 1), principalmente Río Grande que en Quiotepec se une con el río Salado, siendo los dos tributarios del río Papaloapan (Brunel, 2008).



Mapa 1. Santiago Quiotepec, Oaxaca. (INEGI 2005)

Metodología

Colecta de la planta

W. americana se colectó en la comunidad de Santiago Quiotepec, Oaxaca. Dentro del municipio de Cuicatlán, entre las coordenadas UTM Xmax: 715000, Ymax: 1981900 y Xmin: 712300, Ymin: 1979200, a una altitud de 545 msnm. Se llevó un ejemplar al herbario Izta con número de colecta JOM030.

Obtención de los Extractos

Los extractos de *W. americana* se obtuvieron de las partes aéreas (tallos y hojas) por el método de maceración, utilizando solventes de diferente polaridad (metanol, acetato de etilo y hexano). Una vez obtenidos los extractos fueron filtrados y concentrados a presión reducida en un rotavapor. Se determinó el rendimiento total por diferencia de peso (Domínguez, 1973).

Actividad Antibacteriana

Microorganismos utilizados para los bioensayos:

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

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

Evaluación Cualitativa de la Actividad Antibacteriana

Se realizó por el método de Kirby-Baüer (Apéndice II). Cada sensidisco se impregnó con 2 mg de los extractos a evaluar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo sensidiscos con 10 µL de cada uno de los solventes empleados. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Koneman *et al.*, 1996).

Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antibacteriana

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

Curvas de Sobrevivencia

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

Actividad Antifúngica

Microorganismos utilizados para los bioensayos:

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

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

Evaluación Cualitativa de la Actividad Antifúngica

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

Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antifúngica

Para la determinación de la Concentración Fungicida Media (CF_{50}) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se llevó a cabo por el método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) en cepas de hongos filamentosos (Apéndice VI). Como medio de cultivo se utilizó agar de papa dextrosa (PDA). Las concentraciones para cada bioensayo serán de 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

Caracterización Fitoquímica de los Extractos Activos

Los extractos se analizaron mediante las pruebas cualitativas descritas por Domínguez en 1973 (Apéndice VII), de presencia y/o ausencia de alcaloides (Mayer), fenoles (Cloruro férrico), taninos ($FeCl_3$), glicósidos (Molish), terpenos (vainilla y ácido sulfúrico), cumarinas (NaOH), saponinas (prueba de espuma), esteroides y triterpenos (Reactivo de Lieberman-Buchard) (Domínguez, 1973).

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de la actividad antimicrobiana se analizaron mediante una regresión lineal logarítmica para determinar la CF_{50} , utilizando Excel.

Resultados y análisis

El material vegetal fue identificado como *Waltheria americana* con el número de registro JOM030 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de *W. americana*.

Familia	Sterculiaceae	Forma de uso	Infusión y cocimiento
Género	Waltheria	# de colecta	JOM030
Especie	<i>Waltheria americana</i>	Parte utilizada	Aérea y raíz
Nombre común	Cenizo		

Rendimiento de los extractos de *W. americana*

La maceración se realizó a partir de 100 g de la parte aérea de la planta seca. El extracto metanólico de *W. americana* fue el que presentó mayor rendimiento (5.3%), seguido del extracto de acetato de etilo (0.875%), mientras que el extracto hexánico fue el que presentó menor rendimiento (0.28%) (Cuadro 2). Lo que indica una mayor concentración de metabolitos polares.

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos de *W. americana*

Extracto	Peso del extracto (g)	Rendimiento %
Hexano	0.845	0.85
Acetato de etilo	0.875	0.88
Metanol	5.300	5.30

Método cualitativo de la actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos muestran que las cepas bacterianas frente a los diferentes extractos de *W. americana* es variable (Figura 1). El extracto metanólico presentó la mayor actividad inhibiendo 7 de las 20 cepas bacterianas, siendo *S. aureus* cc la que mostró los mayores halos de inhibición (8.3 ± 0.57 mm), seguida de *E. faecalis*, *S. aureus* 23MR y *S. epidermidis* ATCC 12228 (7.6 ± 0.57 mm); *S. aureus* FES-C mostró (7.3 ± 0.57 mm) y por último *S. epidermidis* FES-C (6 ± 0 mm); *K. pneumoniae* ATCC 13883 fue inhibida por los tres extractos (6 ± 0 mm). Los extractos hexánico y acetato de etilo fueron los que presentaron menor actividad. Respecto a los hongos levaduriformes ningún extracto presentó actividad. Observamos que los extractos de *W. americana* presentan una mayor actividad en las bacterias Gram positivas (7.4 ± 0.36 mm) que en Gram negativas (6 ± 0 mm).

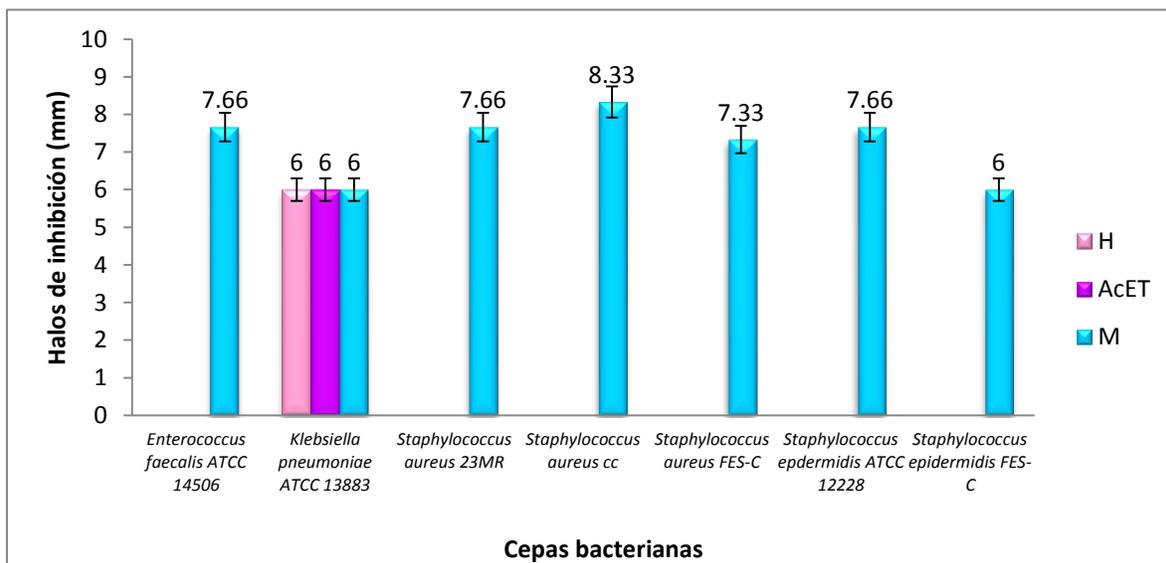


Figura 1. Actividad antibacteriana cualitativa de los extractos de *W. americana*

Método cuantitativo de la actividad antimicrobiana

En la cuadro 3 puede observarse que las bacterias más sensibles al extracto metanólico de *W. americana* fueron: *E. faecalis* ATCC 14506, *K. pneumoniae*

ATCC13883, *S. aureus* 23MR, *S. aureus* cc, *S. aureus* FES-C, *S. epidermis* ATCC 12228 y *S. epidermis* FES-C, ya que se requieren concentraciones mayores a 3 mg/mL para inhibir su crecimiento. Respecto al extracto hexánico y acetato de etilo la única cepa bacteriana sensible fue: *K. pneumoniae* ATCC13883 requiriendo una concentración mayor a 3 mg/mL para la inhibición del crecimiento.

Cuadro 3. Actividad antibacteriana cuantitativa de los diferentes extractos de *W. americana*.

		<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i> 23MR	<i>S. aureus</i> cc	<i>S. FES-C</i>	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> FES-C
Hexano	Halo	-	6 ± 0.0	-	-	-	-	-
	CMI	-	6.0 ± 0.0	-	-	-	-	-
	CBM	-	9.0 ± 0.0	-	-	-	-	-
Acetato de etilo	Halo	-	6 ± 0.0	-	-	-	-	-
	CMI	-	6.0 ± 0.0	-	-	-	-	-
	CBM	-	9.0 ± 0.0	-	-	-	-	-
Metanol	Halo	7.66±0.57	6 ± 0.0	7.66 ± 0.57	8.33±0.57	7.33±0.57	7.66 ± 1.15	6 ± 0.0
	CMI	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
	CBM	9.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0

Los halos de inhibición se expresan en mm y las concentraciones en mg/mL. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; CBM: Concentración Bactericida Mínima; - : No activo. Se presentan el promedio de tres repeticiones.

Curvas de sobrevivencia

En cuanto a la curva de sobrevivencia, se observa en la figura 2, que la concentración de MIC del extracto acetato de etilo probada en la cepa *klebsiella pneumoniae* logro inhibir el crecimiento de la población bacteriana a las 12 horas, mientras que en la concentración CBM presento un efecto bactericida a las 6 horas.

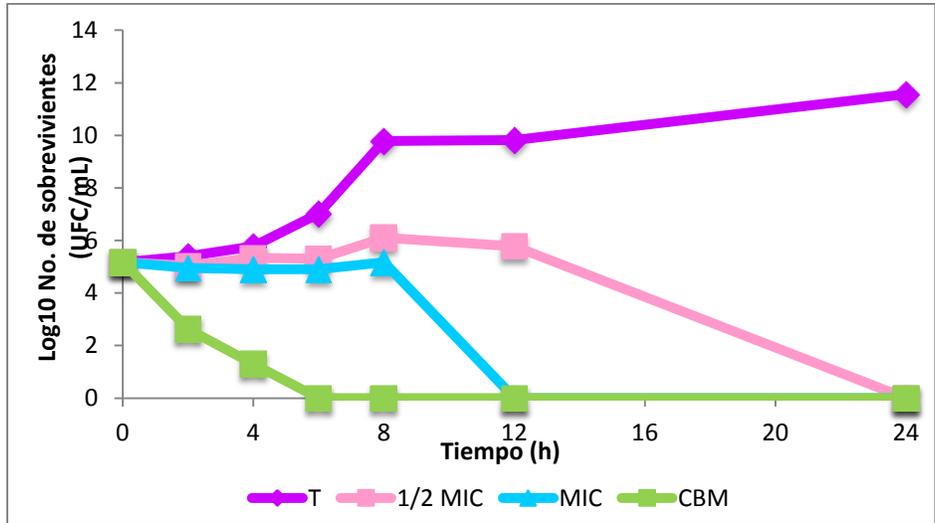


Figura 2. Efecto del extracto acetato de etilo de *Waltheria americana* utilizando una MIC de 6 ml/mL y CBM de 9 mg/mL sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae*

En la figura 3, observamos que las concentraciones $\frac{1}{2}$ MIC y MIC del extracto metanólico presentaron un efecto bacteriostático a las 24 horas y la concentración CBM presentó un efecto bactericida a la misma hora.

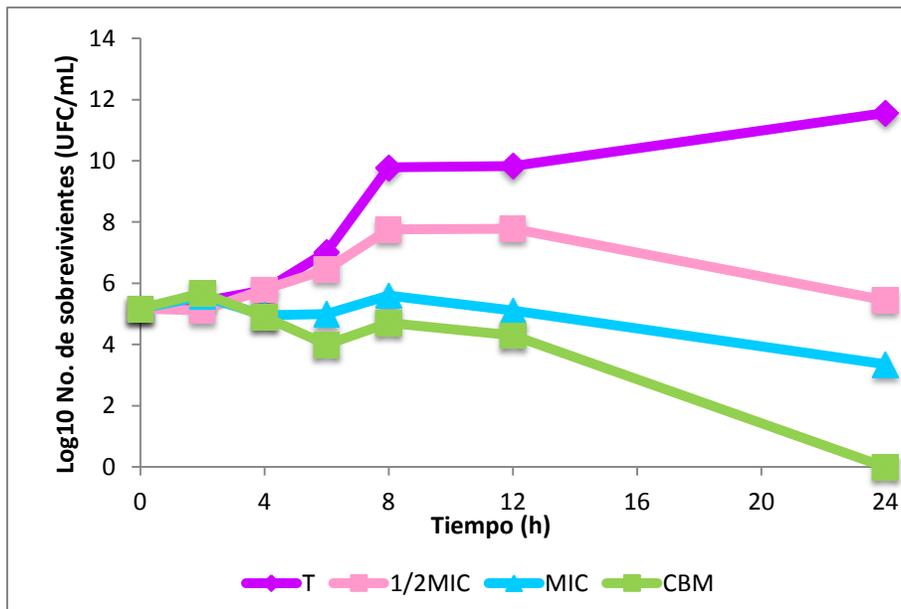


Figura 3. Efecto del extracto metanólico de *W. americana* utilizando una MIC de 6 ml/mL y CBM de 9 mg/mL sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae*.

Respecto a la figura 4, se observa que la concentración $\frac{1}{2}$ MIC del extracto metanólico presenta un efecto bacteriostático a las 24 horas, mientras que la concentración MIC y CBM presentan un efecto bactericida a las 24 y 12 horas respectivamente.

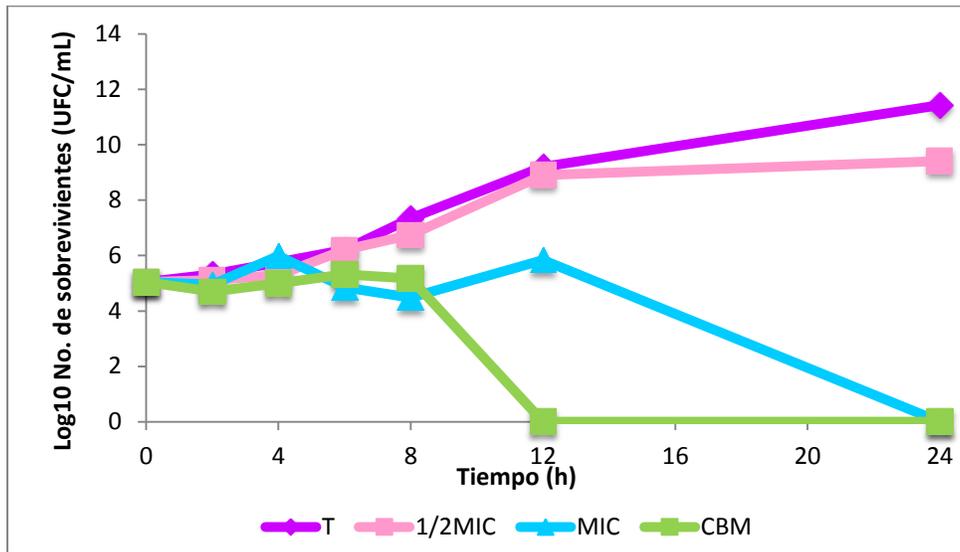


Figura 4. Efecto del extracto metanólico de *W. americana* utilizando una MIC de 6 ml/mL y CBM de 9 mg/MI sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis*.

En la figura 5, se observa que la concentración $\frac{1}{2}$ MIC y MIC del extracto metanólico presentan un efecto bacteriostático a las 24 horas y la concentración CBM presenta un efecto bactericida a las 12 horas sobre una población de *S. aureus*.

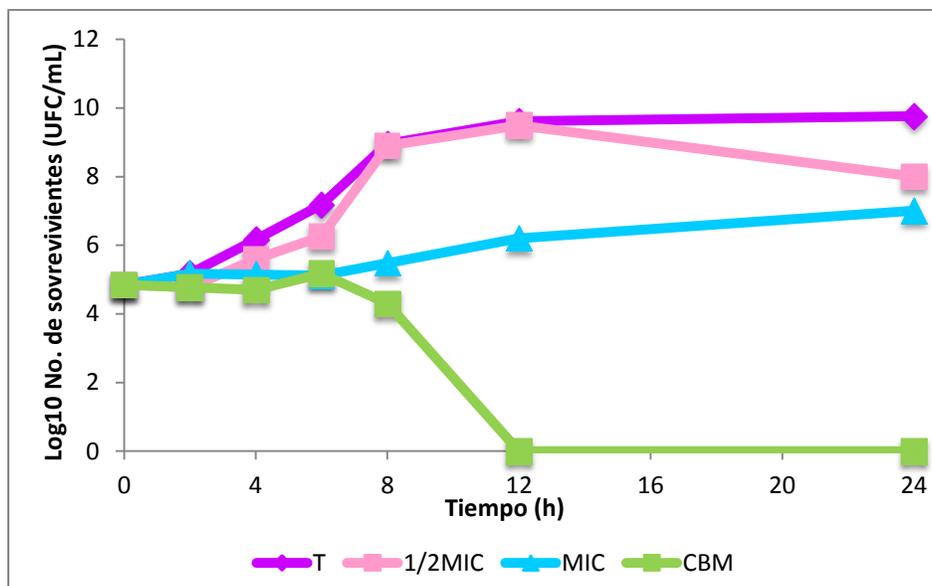


Figura 5. Efecto del extracto metanólico de *W. americana* utilizando una MIC de 6 ml/mL y CBM de 9 mg/mL sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

En el cuadro 4, se muestra el efecto de inhibición del crecimiento radial de los extractos hexano, acetato de etilo y metanol de *W. americana*, como se puede observar, el extracto de acetato de etilo y metanol presentaron actividad en una de las cuatro cepas evaluadas y el extracto de hexano no presentó actividad en ninguna cepa.

Cuadro 4. Actividad antifúngica de los extractos de *W. americana*.

Cepa	Extracto		
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol
<i>T. metagrophytes</i>	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	+	+
<i>F. moniliforme</i>	-	-	-
<i>F. sporotrichum</i>	-	-	-

+ Presenta actividad, - No presenta actividad

Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.

En la figura 6, se puede observar que el extracto acetato de etilo inhibe un 66% el crecimiento de *A. niger* a una concentración de 4 mg/mL del extracto de acetato de etilo.

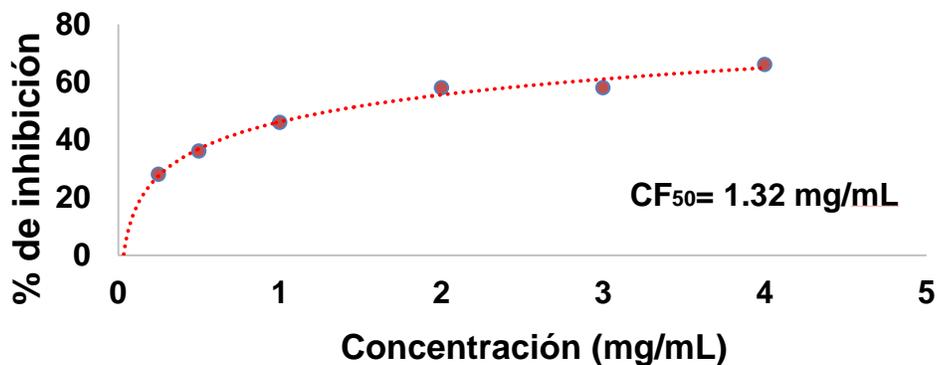


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto de acetato de etilo de *W. americana* sobre *A. niger*.

En el caso del extracto metanólico contra *A. niger* alcanzó una inhibición del 87% a una concentración de 4 mg/mL (Figura 7).

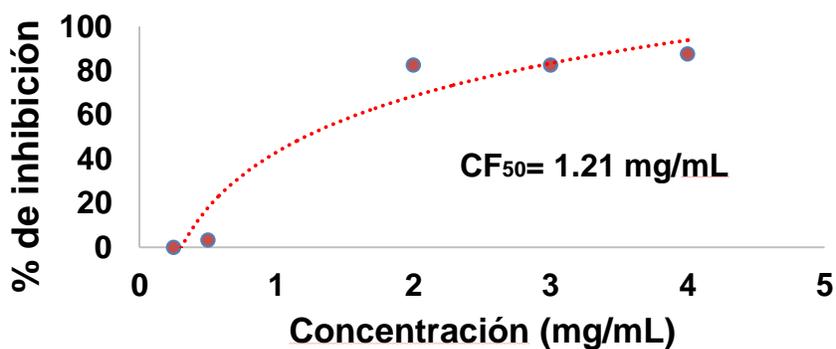


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de *W. americana* sobre *A. niger*.

Caracterización fitoquímica

En la caracterización fitoquímica (Cuadro 5) del extracto acetato de etilo y metanólico se detectó la presencia de fenoles, taninos, glucósidos, cumarinas y esteroides.

Cuadro 5. Caracaterización fitoquímica de *W. americana*.

Grupo de metabolitos secundarios	Extractos	
	Acetato de etilo	Metanólico
Fenoles	+	+
Taninos	+	+
Alcaloides	-	-
Glucósidos	+	+
Saponinas	-	-
Cumarinas	+	+
Esteroides	+	+
Monotepenos	-	-

+ Presenta, - No presenta

Discusión

Desde la antigüedad se han utilizado plantas para diferentes fines, ya sea en el área de alimentos, en la cosmetología o en la medicina, principalmente enfocados a curar o prevenir diversas enfermedades (Negroni, 1999). Los productos naturales tales como los extractos de plantas o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevos medicamentos que puedan ser utilizadas para el control microbiano (Ncube *et al.*, 2008).

En Oaxaca la especie *W. america* es utilizada de forma empírica debido a sus propiedades medicinales que se le atribuyen. En dicha localidad es utilizada como purgativa, analgésica y desinflamatoria.

Los datos de rendimientos de los distintos extractos de *W. americana* muestran que los compuestos de mayor polaridad son los más abundantes, (metanol 5.3%) mientras que los no polares fueron los menos abundantes, (0.845%) como se muestra en la tabla 2. Esto puede deberse a lo mencionado por Del Valle en 2012, quien al realizar un extracto metanólico de la especie *W. berteroi*, obtuvo un mayor rendimiento de éste extracto y lo atribuye a la particularidad del género de producir mayormente compuestos polares. Éstas diferencias también pueden deberse a la época en que la planta fue colectada, etapa de crecimiento, parte utilizada o las condiciones en las que se desarrollaba (Ruiz *et al.*, 2007).

La evaluación de la actividad antibacteriana de los tres extractos (Figura 1) dio como resultado que el extracto metanólico fue el que presentó mayor actividad, ya que inhibió 7 de las 20 cepas. Esto concuerda con los resultados de Cruz en 1996, quien realizó un extracto metanólico de raíces de *W. americana*, mostrando una actividad inhibitoria contra 91.7% de 180 aislamientos clínicos. Como se puede observar de estas 7 cepas, 6 son Gram positivas por lo que el extracto solo tuvo efecto en una cepa Gram negativa y eso puede deberse a que las bacterias Gram negativas presentan compuestos anfipáticos que operan como bombas de expulsión de diversas sustancias, por lo cual, el antibacteriano es expulsado de manera inmediata, sin alcanzar a cumplir el efecto (Domingo y López-Brea, 2003).

Las tres cepas de *S. aureus* fueron las que presentaron mayor sensibilidad hacia los extractos metanólicos, lo cual concuerda con lo reportado por Elegami *et al.* (2001) donde los extractos metanólicos de la parte aérea de *W. americana* presentan un efecto antibacteriano contra esta bacteria Gram positiva.

De acuerdo a los servicios de salud *S. aureus* es un microorganismo que posee características particulares de virulencia y resistencia a los antibióticos. En los humanos causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas. La bacteria se encuentra generalmente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel o en la ropa, y de estos sitios puede transmitirse a otras regiones del cuerpo o membranas mucosas. Se tiene registrado que antes del uso de los antibióticos una enfermedad causada por *S. aureus* producía una mortalidad aproximada del

82%, actualmente se estima un porcentaje entre el 25 y 63% (Howe *et al.*, 1996), por lo cual los resultados obtenidos de este trabajo son de suma importancia.

En la tabla 3, se presenta la CMI y CBM, esto nos permite observar que las bacterias Gram positivas fueron más sensibles; esto puede deberse a la diferencia de la composición de la pared celular, ya que éstas tienen una pared gruesa de peptidoglucano, seguida de una membrana interna y esto permite la facilidad de penetración de sustancias al interior de la bacteria, ocasionándole una alteración en alguna vía metabólica según el mecanismo de acción de los componentes activos. En cambio, las Gram negativas poseen una membrana externa muy compleja, ya que actúa como una barrera, la cual limita la entrada de agentes sin relación química (Macarulla y Goñi, 1994).

El efecto de los extractos acetato de etilo y metanólico de *W. americana* sobre las curvas de crecimiento de *k. pneumoniae* (figura 2 y 3), *S. epidermidis* (figura 4) y *S. aureus* (figura 5) presentaron una actividad bactericida, ya que lograron inhibirlas en un tiempo de 6 a 24 horas en la concentración de CBM. Podemos ver qué ocurre una curva multi impacto, ya que está afectando a varios puntos de la bacteria y no solo a un blanco. Esto se puede comprobar, ya que la muerte de las bacterias no ocurre en las primeras horas (Hernández, 2004).

Estas concentraciones (MIC y CBM) nos proporcionan información sobre en cual concentración los extractos pueden ser bacteriostáticos (aquellos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento) o bactericidas (poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica irreversible), ya que muchas infecciones bacterianas pueden tratarse con agentes bacteriostáticos si el sistema inmune del huésped funciona correctamente y en caso de que no funcione, se utilizan agentes bactericidas (Ingraham e Ingraham, 1998).

El extracto de acetato de etilo (figura 6) y metanólico (figura 7) presentaron actividad antifúngica en la cepa *A. niger* en el análisis cuantitativo presentó mayor sensibilidad frente al extracto metanólico, logrando un 87% de inhibición del

crecimiento a una concentración de 4 mg/mL, mientras que en el extracto de acetato de etilo inhibe un 66% a esa misma concentración. Puede considerarse de efecto moderado, porque en ninguno de los casos los extractos lograron inhibir el 100%. Esto puede asociarse a los compuestos fenólicos, (fenoles y flavonoides) ya que su mecanismo de acción involucrado en la actividad antimicrobiana frente a este tipo de patógenos puede estar relacionado con la inhibición de la germinación de los conidios del hongo (Cushnie y Lamb, 2006). Otro posible mecanismo puede ser, la inactivación de la síntesis de aminoácidos esenciales, causada por la interferencia en las reacciones del fosfoenolpiruvato (De Castro *et al.*, 2010).

Como observamos, los extractos solo presentaron actividad en el hongo filamentoso *A. niger* el cual es un patógeno oportunista que causa infecciones locales y superficiales como las micosis, los efectos tóxicos están relacionados principalmente con intoxicaciones alimentarias, como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas (Alcalá *et al.*, 2005)

El efecto antibacteriano que presentan los extractos de *W. americana* puede deberse a la presencia de distintos metabolitos secundarios, los cuales penetran a las bacterias hasta llegar a su DNA o síntesis de enzimas o proteínas. Algunos metabolitos secundarios presentes pueden ser terpenos, alcaloides y fenoles, los cuales se han reportado que tiene actividad antimicrobiana (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Respecto a la composición fitoquímica en el extracto de acetato de etilo y metanólico hubo presencia de fenoles. Los fenoles tiene una actividad fisiológica marcada, porque poseen propiedades antisépticas, éste tipo de moléculas por lo general presentan fitotoxicidad y esto puede ayudar a la planta a evitar el crecimiento de infecciones (Sepúlveda *et al.*, 2003). Son los compuestos más simples y consisten en un anillo fenólico. Algunas plantas productoras de estos compuestos son el tomillo y manzanilla, cuyo principio activo, la arbutina, ha sido utilizada en el tratamiento de infección urinaria (Domingo y López-Brea, 2003).

El mecanismo está relacionado con inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas (Domingo y López-Brea, 2003).

En cuanto a los alcaloides, no hubo presencia de los mismos, lo que no concuerda con lo descrito por Ragasa *et al.*, 1997 quien al realizar un estudio fitoquímico de la especie reveló la presencia de alcaloides, flavonoides y ácido cafeico, esto puede deberse a que la especie fue recolectada en África y además se utilizó toda la planta, incluyendo las raíces.

Otro compuesto presente en el extracto fueron las cumarinas, las cuales son compuestos derivados de la benzo-alfa-pirona. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitromboticas y vasodilatadoras. Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante la interacción con el DNA, lo que explica también su actividad antiviral (Domingo y López, 2003). Por lo tanto a todos los compuestos presentes, se les puede atribuir la actividad antimicrobiana que presentaron los extractos.

Conclusiones

- El extracto que obtuvo mayor rendimiento fue el metanólico (5.3%).
- El extracto metanólico fue el que presentó mayor actividad inhibiendo 7 de las 20 cepas bacterianas.
- En la cepa *Staphylococcus aureus* cc fue donde se presentó el mayor halo de inhibición.
- El extracto acetato de etilo y metanólico de *W. americana* presentaron actividad sobre el hongo miceliado *A. niger*.
- Los resultados obtenidos validan científicamente el uso de *W. americana* en la medicina tradicional.

Apéndice I.

Waltheria americana

El género *Waltheria* de la familia Sterculiaceae está representada por 60 especies ampliamente distribuidas en África, Estados Unidos (Texas y Florida), México, Belice, Panamá, las Antillas y el sur de América llegando hasta Brasil, siendo *W. americana*, la de más amplia distribución (Burkill, 2000). Presenta una vida ruderal, es un arbusto que alcanza aproximadamente 2 m de altura, 2 cm de diámetro del tallo y presenta un crecimiento perenne (Baudillo, 2008). Las hojas de *W. americana* son concoloras, con estípulas muy delgadas, pecíolos de 0.5-1 cm, hojas gruesas, que van de oblongas a ovalada, miden de 3 a 6 cm de largo y hasta 3 cm de anchas. Son obtusas a redondeadas en el ápice, obtusas a cordadas en la base, tienen margen dentado o bien dientes redondeados, sin pelos hasta densamente pubescente con pelos ramificados en forma de estrella en el haz y envés (Figura 1). Los nervios secundarios están hundidos en el haz y sobresalen en el envés. La inflorescencia son racimos en forma de cabezuela, sésiles o pedunculados, rodeados por brácteas lanceoladas de aproximadamente 0.5 cm, libres entre sí. Comienza a florecer a los 6 meses de edad y florece continuamente hasta su muerte. El glomérulo contiene flores amarillas a anaranjadas y la reproducción está asegurada por semillas (Saunders, 2011), aunque las flores son una fuente de néctar para abejas y avispas, pueden ser útiles para la polinización en áreas perturbadas o ecosistemas agrícolas (João y Martins, 1998). Además de ser sésiles, presentan un cáliz de 4 a 5 mm de largo, con lóbulos lanceolados a angostamente triangular, agudo; pétalos de 6 mm de largo, con una uña en la base de los pétalos, amarillos brillantes; filamentos de los 5 estambres fusionados, flor homostila y ligeramente aromáticas. Y ésta presenta raíces marrones, flexibles y tienen un solo tallo que emerge del suelo (Saunders, 2011).

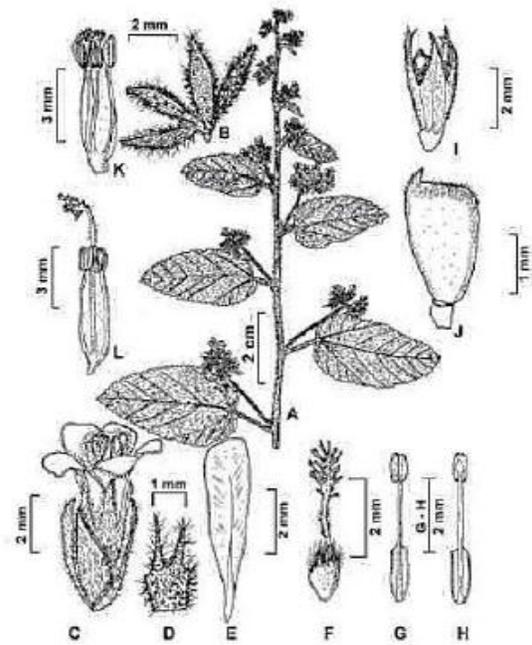


Figura 1. *W. americana* **A.** Rama con flor y fruto. **B.** Brácteas, vista frontal. **C.** Flor brevistila. **D.** Detalle del cáliz, cara abaxial. **E.** Pétalo, cara adaxial. **F.** Gineceo. **G, H.** Estambres, cara abaxial y adaxial. **I.** Cáliz cubriendo el fruto. **J.** Fruto. **K.** Detalle flor mediotstila. **L.** Detalle flor longistila (Baudilio, 2008).

Apéndice II

Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Koneman *et al.*, 1996)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos vegetales. Se utilizan discos de celulosa impregnados con concentraciones estándar de un antibiótico. Estos discos se colocan en placas de agar en las que se realizó la inoculación del microorganismo objeto de evaluación. A medida que las bacterias se multiplican durante la incubación nocturna, el antibiótico muestra difusión en el agar. Alrededor de cada disco aparece una banda de inhibición cuyo tamaño es proporcional a la susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico del que está impregnado el disco. Aplicando criterios estandarizados, se equipará el tamaño de la banda de inhibición con la resistencia o sensibilidad del microorganismo frente al antibiótico (Struthers y Westran, 2005).

Método:

Medio. Se utiliza agar Müeller-Hinton (Bioxon) ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas. El medio debe alcanzar en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino los compuestos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución de compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Inóculo. Se prepara con un asa de siembra estéril, se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de microorganismos a ensayar. Se sumerge en 10 mL de caldo MH, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo del cultivo a 37°C por aproximadamente 24 h o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ML.

Preparación del Estándar. Se prepara añadiendo 0.5 mL de BaCl_2 a 99.5 mL de H_2SO_4 0.36 N (Hendrickson, 1987 citado por Ávila, 1996). La comparación de turbidez entre el

estándar y el caldo con los organismos de estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o con espectrofotómetro.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9% hasta igualarlas. Cuando lo anterior es logrado, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana y se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar MH. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente, se aconseja dejar entreabierta la tapa ya que así se permite la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Por último, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría

Aplicación de extractos. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del No. 5, previamente esterilizados. Al obtenerlos se impregnan con la cantidad deseada de extracto (2 mg de cada extracto disuelto en 10 mL del disolvente correspondiente por sensidisco).

Para la prueba de susceptibilidad se colocan los sensidiscos de manera manual sobre la superficie del agar, con ayuda de una pinza estéril, estos sensidiscos se deben colocar por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa. Se debe presionar suavemente con la punta de las pinzas, con cuidado de no moverlos.

Control positivo. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con 25 µg de cloranfenicol.

Control negativo. Se utilizan sensidiscos impregnados con cada extracto dejándose 12 h evaporando.

Una vez preparadas debidamente las cajas para las pruebas de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36°C, sin mayor tensión de CO₂, debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH.

Interpretación de resultados. Si hay zonas de inhibición el extracto se reporta como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.

Apéndice III.

Técnica de dilución en agar (Koneman *et al.*, 1996)

Concentración mínima inhibitoria. Es el parámetro fundamental para determinar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibiótico. Se introduce en tubos de ensayo una suspensión diluida, de modo que cada uno de los tubos tiene una concentración diferente del antibiótico que pretende ser evaluado. La concentración antibiótica máxima utilizada en esta prueba suele ser de 32 mg/mL. Tras la incubación a lo largo de la noche, se determina la CMI comprobando el crecimiento de las bacterias en cada uno de los tubos, indicado por la turbidez en su interior. La CMI es la concentración menor que inhibe el crecimiento de las bacterias (Struthers y Westran, 2005).

Concentración mínima bactericida. Se realiza con los mismos tubos de la CMI. Si las bacterias sobreviven en los tubos que tienen una dilución superior al doble de la CMI, se considera que las bacterias son “tolerantes” al antibiótico (Struthers y Westran, 2005).

Solución. Se prepara una solución patrón y con base en esta se toman alícuotas correspondientes con la finalidad de obtener las concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL. Una vez agregada cada concentración del extracto la mezcla se agita rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocan en cajas Petri.

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

Control negativo. Se usan cajas con 6 mL de caldo MH con 50 μ L del solvente empleado para disolver el problema.

Control positivo. Se utilizan cajas sin extracto con 6 mL de caldo MH.

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

Apéndice IV

Curva de sobrevivencia (Kubo *et al.*, 1993 citado por Ávila, 1996)

Concentración. La concentración de un antibiótico debe ser eficaz y durar el tiempo suficiente. La concentración debe ser una o varias veces superior a la CMI. Sin embargo, la concentración no tiene que ser tan elevada como para causar toxicidad en el paciente.

Medio. Se utiliza como medio de cultivo el agar MH. Se coloca en cajas Petri septadas.

Inóculo. Se prepara con aproximadamente 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo MH.

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

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

Las cajas se incuban durante 24 horas a 35°C. Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactividad bacteriana, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

Apéndice V.

Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar (Wang y Bun, 2002).

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

Agar. Se utilizan 20 mL de agar papa-dextrosa (PDA), en el cual se pone un botón con el micelio del hongo en crecimiento.

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

Control negativo. Se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L de solvente.

Control positivo. Se usan sensidiscos con 7 μ g de ketoconazol.

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

Apéndice VI.

Determinación de la concentración fungicida media (CF_{50}) y la concentración fungicida mínima (CFM) (Wang y Bun, 2002).

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

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

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

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.

La concentración que presenta el 100% de inhibición es aquella en la que ya o se observa crecimiento, la cual corresponde a la Concentración Fungicida Mínima (CFM); mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la Concentración Fungicida Media (CF_{50}).

Apéndice VII.

Caracterización Fitoquímica por métodos colorimétricos de los extractos (Domínguez, 1979)

Los extractos se analizan mediante las pruebas de presencia y/o ausencia de los grupos de metabolitos secundarios ordenados en la tabla 2:

Tabla 2. Pruebas cualitativas de los principales grupos de metabolitos secundarios con su respectivo reactivo y apariencia positiva.

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

Bibliografía

- Alcalá L., Muñoz P., Peláez T. y Bouza E. (2005). *Aspergillus* y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
- Ávila, J. G. (1996). Actividad anti-*Vibrio Cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de maestría. FES- Cuautitlán. UNAM. México. 234 pp.
- Baudillo R. J. (2008). Revisión taxonómica del género *Waltheria* L. (Sterculiaceae) en Venezuela. *Ernstia* 18: 7-36 pp.
- Bial-Aristegui (2002). El reino de los hongos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2-4 pp.
- Brunel M. C. (2008). Poner la conservación al servicio de la producción campesina, reto para la construcción de un nuevo paradigma de desarrollo. *Argumentos*. México, D.F. 21(57). 115-139 pp. Recuperado en 04 de octubre de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57952008000200006&lng=es&tIng=es.
- Burkill H. M. (2000). *The useful plants of West Tropical Africa*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 686 pp.
- Chifa C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. 9 (4). 242-245 pp.
- Cruz C. A. (1996). Antifungal flavones from *Waltheria Americana* (maestría). De La Salle University. Manila.
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. (2006). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (26). 343-356 pp.
- De Castro H. G., Perini V. B., Santos G. R., Leal T.C.A.B. (2010). Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita *Rev Ciênc Agron*. Vol. (41).308-314 pp.
- Del Valle S. S. C. (2012). Metabolitos secundarios presentes en la planta *Waltheria berteroi* (sterculiaceae) colectada en el estado Amazonas (Venezuela) y su actividad antimicrobiana y letal (Licenciatura). Universidad De Oriente

Núcleo De Sucre Escuela De Ciencias Departamento De Química. Cumaná, Venezuela.

- Domingo D., López- Brea M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Servicio de Microbiología, Hospital universitario de la princesa. Madrid. 16(4). 385-393 pp.
- Domínguez X.A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México. 39-44, 141-143, 211-228, 246 pp.
- Elegami A.A., Almagboul A. Z., Omer M. E. y Tohami E. I. (2001). Sudanese plants used in folkloric medicine: Screening for antibacterial activity. Part X. *Fitoterapia*, 72: 810-817pp.
- Gressler V., Stüker C., Dias G., Dalcol I., Burrow R., Schmidt J. (2008). Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*.(69): 994-999 pp.
- Hernández D. C. T. (2004). Etnobotánica y Actividad Antimicrobiana de algunas plantas utilizadas en la Medicina Tradicional del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Doctorado en Ciencias Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 163pp.
- Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., Cortez D. A. G., Nakamura C.V., Dias Filho B.P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. (97). 1027-1031 pp.
- Howe R.A., Brown N.M. y Spencer R.C. (1996). The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. (49).4-9 pp.
- INEGI 2005, Segundo Censo de Población.
- Ingraham J. L. e Ingraham C. A. (1998). Introducción a la microbiología. Editorial Reverté. Barcelona. 495pp.
- João F.M. y Martins P.R. (1998).Potencial da Erva Daninha *Waltheria americana* (Sterculiaceae) no Manejo Integrado de Pragas e Polinizadores:Visitasde Abelhas e Vespas. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*: (27).29–40 pp.
- Koneman, E., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. (1996). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 909 pp.
- Kong K.F., Schneper L. y Mathee K. (2010). Betalactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 1-36 pp.

- Loaiza G. V. L. (2014). Análisis del efecto antiviral de *Waltheria americana* L (Standley y Steyermark, 1949) En el proceso infectivo de rotavirus humano sobre células MA 104. Tesis (Maestría en Ciencias). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Macarulla J.M. y Goñi F. M. (1994). Bioquímica humana. Curso básico 2ª edición, editorial Reverté. Barcelona, Bogotá, Buenos Aires, México. 161-163 pp.
- Martínez J. L. y Marinoff M.A. (2008). Historia de las plantas medicinales: su evolución e implicancias en Chile, Capítulo 8 en: Comprender el mundo a través de la Historia de la Ciencias. Mario Quintanilla y Gerardo Saffer, compiladores. Una producción G.R.E.C.I.A. - Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, 49-58 pp.
- Ncube N. S., Afolayan A. J. y Okoh A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. African Journal of Biotechnology. 7 (12). 1797-1806 pp.
- Negroni M. (1999). Microbiología Estomatológica. Editorial Panamericana. Argentina.
- Nigenda G., Mora F. G., Aldama L. S., Orozco N. E. (2001). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *Salud Pública de México*.
- Ocegueda S., Moreno E. y Koleff P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversidad. (62).12-15 pp.
- Olajuyigbe, O., Babalola, E. and Afolayan, J. (2011). Antibacterial and phytochemical screening of crude ethanolic extracts of *Waltheria indica* Linn. African Journal of Microbiology. 5(22). 3760-3764 pp.
- OMS. (2002). Consejo ejecutivo 111ª reunión.
- OMS/WHO. (1978). Promoción y desarrollo de la medicina tradicional. Serie de informes técnicos, número 622. Ginebra.
- Ragasa C. Cruz C. Tada M. y Rideout J. (1997). Flavonoids from *Waltheria americana*. Philippine Journal of Science, 126:250.
- Ruiz C., Tunarosa F., Martínez J., Stashenko E. (2007). Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia*

origanoides H. B. K. obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica*. 13 (33). 325-328 pp.

- Saunders J.G. (2011). Resurrection of the Maui endemic *Waltheria pyrolifolia* (Sterculiaceae, Hermannieae. *Darwiniana* (49).76–85 pp.
- Schulz H. N., Brinkhoff T., Ferdelman T.G., Marine M.H., Teske A. y Jorgensen B.B. (1999) Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science*. 493-495 pp.
- Sepúlveda J. G., Porta D. H. y Rocha S. M. (2003).La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de fitopatología*. 21(3). 355-363 pp.
- Soto F. (2011). Caracterización química, fitoquímica y antibacteriana *in vitro* de las hojas del *Anacardium occidentale* L. (Marañón) [Tesis en opción a Máster en Química-Biológica]. Bayamo, Granma, Cuba.
- Struthers K. J. y Westran R.P. (2005). Bacteriología clínica. Masson. España. 49-56 pp.
- Villavicencio M. A. y Pérez E. B. (1995). Plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Wang H. y Bun T. N. (2002). Insolation of an Antifungal Thaumatin-like portein from kiwin fruits. *Phytochemistry*. (61): 1-6 pp.
- Zongo F., Ribuo C., Boumendjel A., Guissou I. (2013). Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (syn. *Waltheria americana*): A review. *Journal of Ethnopharmacology*. (18). 14-26 pp.