



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Evaluación de la actividad antibacteriana
del extracto acuoso de la Bayetilla
(*Hamelia patens* Jacq.; Rubiaceae)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KAREN MARIANA LUJÁN HERNÁNDEZ



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNÁNDEZ

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

Datos de la Tesis

1. Datos del alumno:

Apellido paterno: Luján
Apellido materno: Hernández
Nombre (s): Karen Mariana
Teléfono: 63 65 69 43
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela: Facultad de Ciencias
Carrera: Biología
Número de cuenta: 30602840-1

2. Datos del tutor:

Grado: Dra.
Apellido paterno: Osuna
Apellido materno: Fernández
Nombre (s): Helia Reyna

3. Datos del sinodal I:

Grado: M. en C.
Apellido paterno: Gómez
Apellido materno: Campos
Nombre (s): Armando

4. Datos del sinodal II:

Grado: Dr.
Apellido paterno: Cristians
Apellido materno: Niizawa
Nombre (s): Sol

5. Datos del sinodal III:

Grado: M. en C.
Apellido paterno: Zúñiga
Apellido materno: Ruiz
Nombre (s): Beatriz

6. Datos del sinodal IV:

Grado: Q. A.
Apellido paterno: Muñoz
Apellido materno: Ocotero
Nombre (s): Verónica

AGRADECIMIENTOS

A todos los involucrados directa o indirectamente en esta parte tan importante de mi vida:

A mi tutora, la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández por su paciencia, su ánimo y su apoyo académico durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales el M. en C. Armando Gómez Campos y el Dr. Sol Cristians Niizawa por su gran aporte en las correcciones de resultados y discusión de este trabajo.

A la M. en C. Beatríz Zúñiga Ruiz por su participación en las correcciones y revisiones al trabajo.

Un agradecimiento especial para la Q. A. Verónica Muñoz Ocotero por todas sus enseñanzas, su paciencia y sobre todo su ayuda para la realización de esta tesis.

A la M. en C. María Eugenia Díaz de León del Taller de Plantas II, por el apoyo técnico brindado a lo largo de este trabajo.

Al M. en C. José Manuel Hernández Solís del Taller de Análisis Ambiental, por el apoyo técnico para la elaboración de liofilizados.

Al Q. F. B. Alejandro Camacho, responsable del cepario de la Facultad de Química de la UNAM por las cepas proporcionadas.

Y gracias a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, esta excepcional casa de estudios de la que puedo llamarme orgullosamente egresada.

Agradezco a Dios y a la vida por permitirme estar en este lugar y en este tiempo para lograr uno de mis más grandes sueños: una carrera universitaria.

Gracias a mis padres Lourdes y Luis, por todo el apoyo, el cariño y el ánimo para luchar siempre, gracias por creer en mí y darme la maravillosa oportunidad de para convertirme en lo que soy ahora.

A mi hermana Leslie, por ser un motivo para seguir y no dejarme vencer, para hacer a un lado el miedo y atreverme.

A mi familia entera por ser mi hogar y mi refugio.

Un agradecimiento muy especial a Jorge Antonio Ramírez Arce, por todo su amor, por estar siempre a mi lado y alentarme a creer en mí misma, a convertir los sueños en realidad y a descubrir que la vida es maravillosa.

Gracias a mis amigas Ana y Nayeli, por todas las aventuras y anécdotas que acompañan cada página de esta tesis.

Finalmente agradezco a cada persona y acontecimiento en mi vida que me inspiraron a estudiar biología, porque no me imagino a mí misma haciendo algo diferente.

ÍNDICE

I. RESUMEN	8
II. INTRODUCCIÓN	9
III. ANTECEDENTES	10
1. Plantas medicinales en el mundo	10
2. Las plantas medicinales en México	11
3. Efecto o actividad de las plantas medicinales	12
4. Enfermedades tratadas con plantas en México	13
4.1. Especies útiles con base en los síntomas	13
4.2. Enfermedades dérmicas y su importancia	14
4.3. Infecciones bacterianas	15
4.4. Herbolaria mexicana como remedio para enfermedades dérmicas	16
5. Bayetilla: <i>Hamelia patens</i> Jacquin (1760)	17
5.1. Clasificación taxonómica	17
5.2. Descripción botánica	18
5.3. Distribución en México y América	20
5.4. Estudios realizados	21
IV. JUSTIFICACIÓN	25
V. OBJETIVOS	26
VI. MÉTODO	27
1. Consulta de herbarios y mapa de distribución	27
2. Colecta	27
3. Preparación de extractos acuosos: decocción	27

4. Ensayo <i>in vitro</i>	28
5. Análisis cromatográfico	29
6. Autobiograma	30
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
1. Mapa de distribución	31
2. Extractos vegetales y rendimiento	32
3. Ensayo de actividad antibacteriana <i>in vitro</i> por el método de microdilución en placa	33
4. Análisis cromatográfico	36
5. Autobiograma	40
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. PERSPECTIVAS	47
X. REFERENCIAS	48
XI. ANEXOS	57
1. Lista de reactivos	57
2. Resultados del método de microdilución: Microplacas	58
▪ <i>Bacillus subtilis</i>	59
▪ <i>Escherichia coli</i>	61
▪ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	63
▪ <i>Pseudomona aeruginosa</i>	65
▪ <i>Staphylococcus aureus</i>	67
▪ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	69
▪ <i>Staphylococcus pyogenes</i>	71

La Sociedad Farmacéutica Mexicana, al escribir la nueva edición de la Farmacopea Mexicana:

"Se extrañará que en esta parte de la Farmacopea Mexicana, se mencionen multitud de plantas y productos indígenas, que ni se usan por los médicos, ni se venden en nuestras boticas;

[...] porque muchas de ellas pueden sustituir a ciertas drogas exóticas [...]

Ojalá que estas indicaciones sirvan de base a estudios más completos, y que dentro de unos años tenga México una terapéutica verdaderamente nacional, aprovechándose las innumerables riquezas de la hermosa y variadísima flora con que el Creador ha querido embellecer nuestro extenso territorio..."

La Sociedad Farmacéutica Mexicana,

Nueva Farmacopea Mexicana. 1884



I. RESUMEN

La bayetilla (*Hamelia pantens* Jacq.) es una planta nativa de México a la cual se le atribuye efecto medicinal para el tratamiento de heridas o infecciones en la piel; se realizan decocciones de hojas o de tallos y el extracto se aplica en forma de baños o lavados en la zona afectada.

Se han realizado pruebas *in vitro* contra algunas bacterias patógenas utilizando diferentes órganos de esta planta en forma de extractos hexánicos, clorofórmicos, acetónicos, etanólicos, metanólicos y acuosos. Sin embargo, no se han realizado ensayos específicos contra bacterias patógenas cutáneas; por ello, en este trabajo se realizaron pruebas *in vitro* para evaluar los extractos acuosos de hojas y de tallos de la bayetilla en *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aureoginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Streptococcus pyogenes*, a través del método de microdilución en caldo.

Los resultados mostraron susceptibilidad bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* frente al extracto acuoso de hojas [$1.25E^2$ µg/mL] y de *Staphylococcus aureus* frente al extracto acuoso de tallos [$4.7E^3$ µg/mL]. El análisis cromatográfico y el autobiograma de ambos extractos mostró que las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano correspondieron con la presencia de flavonoides y alcaloides. Se hace una revisión de los metabolitos que han sido encontrados en la planta y de su efecto antibacteriano. Este trabajo contribuye al estudio de la especie y a continuar con los ensayos preclínicos que puedan llevar al desarrollo de un fitomedicamento

II. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2004 señala que el 80 % de la población de todo el mundo utiliza plantas medicinales como medida de atención primaria a la salud. Lo que trae consigo un creciente interés en el estudio y validación de las plantas de uso tradicional con la finalidad de crear más y mejores fármacos y de encontrar alternativas para el tratamiento de enfermedades.

En nuestro país el uso de las plantas medicinales ha sido una parte muy importante de la cultura desde la época prehispánica. Las enfermedades o afecciones cutáneas son uno de los padecimientos con mayor número de especies vegetales utilizadas (más de 100) (Caballero y Cortés, 2001), pues dichas enfermedades son frecuentes en zonas con algún grado de marginación (CONAGUA, 2011). Una de las plantas utilizada contra infecciones y heridas en piel es la bayetilla (*Hamelia patens* Jacq.); se utiliza la decocción de sus tallos y hojas en forma de baños sobre el área afectada. Sin embargo, aunque se han realizado estudios evaluando la actividad de diferentes extractos obtenidos de *H. patens* con diferentes disolventes en distintos microorganismos, no hay estudios que se enfoquen en la comprobación de algún efecto de extractos acuosos contra bacterias patógenas cutáneas que tenga como fundamento el conocimiento tradicional ni los registros etnobotánicos.

III. ANTECEDENTES

1. Las plantas medicinales en el mundo.

El empleo de prácticas tradicionales como alivio a padecimientos y enfermedades ha resultado accesible en precio y cercanía en muchas comunidades de todo el mundo, sobre todo en aquellas con algún grado de marginación, de forma que los remedios herbales son utilizados para tratar padecimientos cuando *“el doctor es caro o cuando está lejos”* (Jüttner, 1983).

En el 2004, la medicina tradicional ya era utilizada por el 80 % de la población mundial, en países en vías de desarrollo como alternativa a los servicios de salud, pues con frecuencia, dichos servicios no logran llegar a cada una de las comunidades que los requieren, de forma que la medicina tradicional resulta asequible por su bajo costo, además de que los insumos son de libre venta y su uso mantiene una estrecha relación con su cultura (OMS, 2002; OMS, 2004). En países desarrollados, los remedios tradicionales han sido preferidos frente a los medicamentos sintéticos, por considerarse una fuente de salud de origen natural y con menores efectos secundarios (OMS, 2004). Es por ello que en 1974, la OMS hizo un llamado para incorporar la medicina tradicional a la estrategia global de salud, a través del desarrollo de guías de uso, de políticas nacionales en diversos países, de estándares internacionales y métodos para la investigación sobre productos y terapias tradicionales, apoyando proyectos de estudios clínicos sobre seguridad y eficacia, entre otros (OMS, 2002).

Dentro de la medicina tradicional, el tratamiento más común es el uso de plantas medicinales, que son obtenidas a través de la recolección de especies y variedades silvestres o domesticadas (OMS, 2013).

Es por ello que surge el interés en su estudio en todo el mundo, en Europa y Asia ya se analizan los remedios herbales desde principios del siglo XIX con la finalidad de obtener medicamentos botánicos que ayuden a combatir las enfermedades actuales (Schulz *et al.*, 2001).

2. Las plantas medicinales en México.

México es un país con gran diversidad cultural, ecológica, climática, topográfica y vegetal, lo que da como resultado una amplia gama de usos atribuidos a las plantas desde la época prehispánica, como lo han descrito textos de la época colonial, tales como “Historia general de las cosas de la Nueva España” (también conocido como Códice Florentino) escrito por Fray Bernardino de Sahagún en 1549; “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” (Libro sobre las hierbas medicinales de los indios; también conocido como Códice De la Cruz-Badiano) escrito por Martín de la Cruz en náhuatl y traducido al latín por Juan Badiano en 1552; “Plantas de la Nueva España” escrita por Francisco Hernández durante su exploración de 1571 a 1577; entre otros. México es entonces un país donde la herbolaria ha sido una parte muy importante de la cultura.

En 1994 en México la medicina convencional o alópata se encontraba sólo en el 40 % de los servicios de salud, por lo tanto, resultaba inaccesible la atención médica para más de la mitad de la población, como consecuencia de esto, el 25 % de la población dependía del uso de las plantas como principal remedio ante la enfermedad (Argueta *et al.*, 1994).

En relación a la gran diversidad vegetal en México, Caballero y Cortés (2001) consideran que existen más de 7,000 especies de plantas útiles de las casi 23,000 especies de plantas vasculares que se encuentran en nuestro país (Rzedowski, 1992).

En 2001, la Base de Datos Etnobotánicos de Plantas de México (BADEPLAM) registró 3,500 especies de plantas vasculares utilizadas de forma tradicional, es decir, la mitad de las estimadas por Caballero y Cortés (2001). El 50 % de dichas plantas registran más de un uso y el 25 % más de cinco usos distintos, siendo el principal el uso medicinal con 2,140 especies, seguido por el alimenticio con 948 especies, entre otros (Caballero y Cortés, 2001). Sin embargo, Linares y colaboradores (1999), sugieren que las especies con uso medicinal podrían llegar a las 3,000.

3. Efecto o actividad de las plantas medicinales.

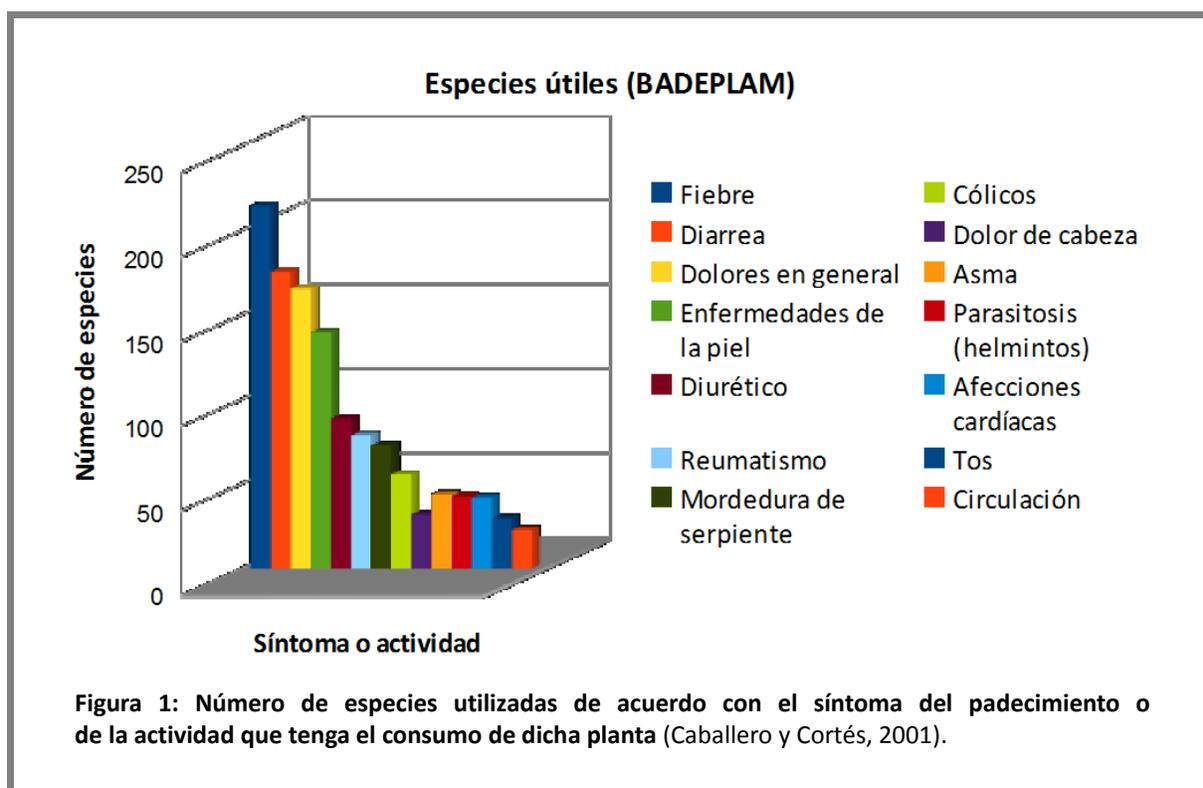
La actividad que presente una planta sobre una persona que hace uso de ella depende de los compuestos químicos que se encuentran en dicha planta o parte de ella, tales como hojas, tallos, flores, corteza, semillas, entre otros. Sin embargo, la presencia o concentración de dichos compuestos, estará determinada por las características de la planta, tales como su edad y madurez, así como por diversos factores relacionados con su ambiente de crecimiento, tales como radiación solar, humedad del suelo y del aire, disponibilidad de nutrientes en el suelo, el tipo de suelo, plagas o enfermedades que haya padecido, e incluso la fase lunar durante la cual sea recolectada, entre otros (Acosta de la Luz, 2003). Como ejemplos de ello tenemos que plantas muy jóvenes o muy viejas tendrán una menor producción y/o calidad de principios activos; los suelos ácidos favorecen la formación de alcaloides; y la humedad determinará la concentración de la o las sustancias activas en los órganos vegetales. Además, la presencia y la concentración de los compuestos activos también estará determinada por la forma de recolección, almacenamiento, preparación, forma de aplicación o presentación y dosis (Schulz *et al.*, 2001).

En las plantas silvestres los compuestos químicos son muy variables cuantitativa y cualitativamente, es por esto que la dosificación resulta imprecisa (Schulz *et al.*, 2001). Por ello se ha recurrido al aislamiento de compuestos químicos a través del método científico, sin embargo, la finalidad del aislamiento no es la concentración de la sustancia con actividad farmacéutica, sino lograr la elaboración de un producto estandarizado (Schulz *et al.*, 2001).

4. Enfermedades tratadas con plantas en México.

4.1. Especies útiles con base en los síntomas.

La fiebre, la diarrea, los dolores y las enfermedades de la piel son los cuatro padecimientos tratados con mayor número de plantas según lo registrado en el BADEPLAM en 2001. Los síntomas o actividad farmacológica relacionada con los padecimientos cutáneos ocupan el lugar número cuatro, con poco menos de 150 especies utilizadas para este fin (Fig 1). En este punto es importante mencionar, que síntomas como la fiebre, ubicada en primer lugar por tener más de 200 especies utilizadas como remedio herbolario, es consecuencia de infecciones relacionadas con padecimientos gastrointestinales e infecciones en piel, entre otros.



4.2. Enfermedades dérmicas y su importancia.

El abastecimiento de agua como servicio público resulta insuficiente en muchos de los municipios del país, alcanzando el 78.6 % en zonas rurales. Ello se ve reflejado en la población como falta de aseo que tiene como consecuencia la aparición de enfermedades de carácter infeccioso, tales como lo son padecimientos gastrointestinales, dermatológicos, entre otros (CONAGUA, 2011).

Dentro de las enfermedades dérmicas, se encuentran aquellas cuyos signos consisten generalmente en salpullidos, granos, picazón, ardor, úlceras y/o llagas. La causa de una manifestación cutánea es variada (Cuadro 1), incluye desde las causadas por microorganismos, hasta aquellas con causa aun desconocida (Amado, 2001B).

Cuadro 1. Causas de los padecimientos dérmicos más comunes en orden decreciente (Muñoz-García, 1999; Amado, 2001B).		
Frecuencia	Patología	Causa
1	Micosis	Hongos
2	Dermatitis solar hipocromiante	Exposición al sol
3	Verrugas	Virus
4	Dermatitis atópica	En discusión, no infecciosa.
5	Melasma	Variación hormonal
6	Dermatitis seborreica	Producción excesiva de grasa
7	Psoriasis	Posible causa autoinmunitológica y/o genética.
8	Impétigo	Bacterias
9	Acné	Obstrucción de folículos pilo-sebáceos por exceso de grasa.
10	Dermatitis por contacto	Reacción a sustancias alergénicas.

4.3. Infecciones bacterianas.

El impétigo es uno de los padecimientos más comunes de carácter infeccioso que ocupa el octavo lugar de acuerdo con su frecuencia. Las infecciones usualmente se manifiestan como consecuencia de la falta de cuidados en heridas abiertas o como resultado de una baja en el sistema inmunológico (Amado, 2001B).

Cuadro 2. Principales padecimientos cutáneos causados por bacterias, sus signos y los microorganismos causantes (Amado, 2001A; Amado, 2001B; Arenas, 2005; Magaña-García y Magaña-Lozano, 2011).		
Padecimiento	Signos	Microorganismo
Impétigo	Ampollas o vesículas con costras cerosas Principalmente cerca de orificios naturales Hay prurito	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> (beta-hemolítico) <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas aureoginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp.</i>
Foliculitis	Inflamación del folículo pilo-sebáceo-apócrino Furúnculo doloroso en región pilosa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Erisipela	Placas eritematosas y edematosas bien definidas	<i>Streptococcus pyogenes</i> (beta-hemolítico) <i>Staphylococcus aureus</i>
Celulitis	Inflamación de tejido adiposo subcutáneo Placas edematosas y eritematosas dolorosas desarrolladas al rededor de una herida o úlcera	<i>Streptococcus pyogenes</i> (beta-hemolítico)
Ectima	Costras y úlceras. Surge por falta de aseo y como consecuencia de impétigo no tratado.	<i>Streptococcus pyogenes</i> (beta-hemolítico) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i>
Forunculosis	Pústulas o abscesos dolorosos. Afección más profunda del folículo.	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hidrosadenitis	Inflamación de las glándulas apócrinas que produce obstrucción y rotura de los conductos sudoríparos con inflamación local.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>E. coli</i>
Eritrasma Queratosis plantar	Afección manifestada en pies	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Pseudomona sp.</i>

4.4 Herbolaria mexicana como remedio para enfermedades dérmicas.

La bayetilla *Hamelia patens* Jacq. es referida como la quinta planta con mayor número de menciones en entrevistas sobre el uso de remedios herbolarios para el tratamiento de enfermedades entre la población de Tlanchinol, Hidalgo (Andrade-Cetto, 2009). El mismo estudio señala su principal uso en forma de infusión contra la gastritis (oral), seguida por el dolor de estómago (oral) y el tratamiento heridas superficiales (tópico).

5. Bayetilla: *Hamelia patens* Jacquin (1760).

Nombres comunes en México: bayetilla, madura-plátano, chacloco, canutillo, hierba del toro, vara prieta, cacahuaxúchitl (nahuatl), tres hojitas, hierba coral, tochomite, trompetilla; Puebla: imegchichi (náhuatl), maktantulon (totonaco), tohtu (otomí); Quintana Roo: chache, chakloc, chaktok, k'anan, x-kanan (maya, "guardián de la selva"); Veracruz: "canhoc", "xixcuy"; Yucatán: "chak took", "k'anan xiw", "xk'anan" (maya); San Luis Potosí: "k'entsel te", "tsak lok" (tenek) (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Grandtner, 2005; Villaseñor y Espinosa, 1998).

5.1. Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica la ubica dentro de la familia de las rubiáceas y género *Hamelia* (Cuadro 3), teniendo como nombres sinónimos: *H. erecta* Jacq. y *H. nodosa* M. Martens & Galeotti (Stevens *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica (Jacquin, 1760).	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Hamelia</i>
Especie	<i>Hamelia patens</i> Jacq.

5.2. Descripción botánica.

Se trata de un arbusto o árbol nativo de México pequeño que alcanza una altura no mayor a 5 m. Puede ser glabra o pubescente (Jacquin, 1760, CONABIO, 2011).

Sus hojas son pecioladas, de forma lanceolado-oblongas de 5 a 21 cm de largo, ápice acuminado, base aguda a obtusa, consistencia papirácea, con 5 a 11 pares de nervaduras secundarias. Los pecíolos miden de 5 a 80 mm de largo; y de filotaxia opuesta o verticilada (Fig. 2), son delgadas, y están en grupos de 3 a 5 asociadas a estípulas de 1.5 a 6 mm de largo (Elias, 1976; Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Ocampo & Balick, 2009).



Figura 2. *Hamelia patens* Jacq. IZQ. Filotaxia verticilada, hojas lanceoladas-oblongas e inflorescencias terminales (CONABIO, 2011). CENTRO. Detalle de flores tubulares (Horticultural Gardens in Texas, 2009). DER. Drupa de 1.3 cm de longitud. (Pronativas, 2010).

La inflorescencia es terminal de 3–15 cm de largo y 5–20 cm de ancho, presenta numerosas flores hermafroditas tubulares a acampanadas de color rojo oscuro a anaranjado con corola de 1.5 a 2 cm de largo pudiendo ser pubescentes (Fig. 2), el cáliz mide de 2.5 a 3 mm de largo; el tubo floral mide entre 12 y 23 mm de largo, con lóbulos de 1 a 2.5 mm de largo. El pedúnculo mide de 5 a 40 mm de largo aproximadamente. Los frutos son drupas de forma oblonga de 7 a 13 mm de largo y 4 a 10 mm de ancho, de color rojo a negro cuando maduran, crecen en racimos. Presenta flores y frutos todo el año. Las semillas son numerosas y angulosas (Jacquin, 1760; Elias, 1976; Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Ocampo & Balick, 2009).

5.3. Distribución en México y América.

Abundante en zonas con vegetación secundaria en todo el país. Habita en climas cálido y semicálido. Naturalmente se encuentra en bosque tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, además bosques de encino y de pino, desde el nivel del mar hasta los 1,600 msnm (Stevens *et al.*, 2001); desde el sur de los Estados Unidos (Florida) hasta Argentina (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En México se ha registrado en los Estados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998) (Fig.3). En nuestro país se cuenta con ejemplares de herbario en: CICY, CIQRO, ENCB, IMSS, IZTA, MEXU, XAL (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



5.4. Estudios realizados.

Etnobotánica

Al tratarse de una especie con una gran distribución, le han sido referidos numerosos usos tradicionales (Cuadro 4).

Cuadro 4. Principales usos medicinales de <i>H. patens</i> , parte utilizada, modo de preparación, modo de empleo y referencias.				
Uso	Parte utilizada	Modo de preparación	Modo de empleo	Referencias
Gastritis	Hojas y parte aérea	Infusión	Oral	Andrade-Cetto, 2009
Dolor de estómago			Oral	
Heridas en piel			Oral / Tópico	
Granos	Hojas	Decocción	Tópico	Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana UNAM, 2009.
Heridas en piel		Macerado		
Cicatrizar		Decocción	Oral	
Gastritis/úlceras				
Llagas/erupciones	Hojas, tallos y flores	Decocción	Tópica	Taylor, 2005.
Heridas o quemaduras en piel				
Infecciones de la piel				
Piodermitis	Hojas	Infusión	Tópico	Beyra <i>et al.</i> ; 2004.
Afrodisíaco	Tallos	Decocción	Oral	
Dolor de cabeza	Hojas y tallos	Natural	Tópico	Weniger, 1986.
Hongos de los pies	Hojas	Macerado	Tópico	Díaz y Ortega, 2006.
Heridas en la piel/Úlceras	Savia	Natural	Tópico	Martínez-Alfaro <i>et al.</i> , 2001.
Granos	Ramas Hojas	Decocción	Tópico	
Dolor de estómago	Hojas y ramas	Infusión	Oral	

Cuadro 4. (Continuación)

Dolor de cabeza	Hojas	Compresa	Tópico	Grandtner, 2005.
Heridas en piel				
Infecciones de la piel		Macerado		
	Hojas y frutos			
Hongos en pies	Hojas	Decocción	Tópico	Andoque-Andoque, 2009.
Heridas/Llagas Granos	tallos	Decocción	Tópico	Romo-Díaz, 2013.
Infecciones de la piel	Hojas	Decocción	Tópico	
Granos	Planta completa	Decocción	Tópico	Mendieta y Del Amo, 1981.
Abscesos/Heridas Úlceras	Hojas			
Comezón				
Heridas	Hojas	Decocción	Tópico	Pulido-Salas y Serralta- Peraza, 1993.
Salpullido				

Tópico: aplicación en baños o cataplasmas directamente sobre el área afectada.

Fitoquímica

Respecto a la caracterización química de compuestos presentes en distintos extractos elaborados a partir de la planta completa y de hojas se han encontrado metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, entre otros, generalmente responsables de la actividad medicinal en plantas (Acero de Mesa *et al.*, 2007) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Metabolitos secundarios identificados en estudios de fitoquímica de <i>H. patens</i>.		
Extracto (parte utilizada)	Metabolitos hallados	Referencia
Acetónico (hojas)	2 alcaloides (aricina y aricina oxindol), 1 flavonoide (Catequina), 2 esteroides (β -sitosterol y estigmasterol), 1 sesquiterpeno y triterpenos (ácido rotúndico; ácido ursólico)	Ríos y Guadarrama, 2006.
Metanólico (partes aéreas)	Flavonoides: Glicósido 5,7,2', 5'-tetrahidroxiflavanona 7-rutinósido; rutina (quercetina 3-rutinósido) y Narirutina (naringenin-7-O-rutinósido) y un ácido fenólico (ácido rosmarínico).	Aquino <i>et al.</i> , 1990.
Metanólico (hojas)	Alcaloides (isopteropodina, alcaloide A, palmirina, rumberina, maruquina)	Reyes-Chilpa <i>et al.</i> , 2004.
Etanólicos (hoja)	Esteroides, saponinas, alcaloides, polifenoles, taninos y 2 esteroides o triterpenos.	Jiménez-Suárez, 2001; Sanabria-Galindo <i>et al.</i> , 1997.
Etanólico (planta completa)	13 alcaloides indólicos	Monge-Cubas y Salinas-Guerrero, 2009.

Otros compuestos identificados son la efedrina; flavonoides como la petunidina y malvidina (en raíz); y alcaloides como la isomaruquina y pteropodina, y los alcaloides indólicos tetrahidroalstonina, especiofilina y seneciofilina (Chaudhuri y Thakur, 1991; Borges *et al.*, 1979; Borges *et al.*, 1982; Arias-Adams *et al.*, 1989).

Ensayos de susceptibilidad bacteriana in vitro

Se han realizado también estudios *in vitro* en diferentes países con el fin de validar el efecto de diversos extractos de *H. patens* frente a bacterias patógenas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Evaluación de extractos de *H. patens* en ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento bacteriano.

Cepa	Parte usada				Extracto						Método	Cita
	C	H	T	F	Hx	CF	ACT	EtOH	MeOH	Ac		
<i>E. coli</i>							+			+	Difusión en agar	Singh <i>et al.</i> , 2014
									+		Microdilución en caldo	Yasunaka <i>et al.</i> , 2004
										+	Difusión en agar	Sridevi <i>et al.</i> , 2011
					+	-			+		Microdilución en caldo	Camporese <i>et al.</i> , 2003
<i>B. subtilis</i>										+	Difusión en agar	Sridevi <i>et al.</i> , 2011
								+			Sin especificar	Sanabria-Galindo <i>et al.</i> , 1998
							+		+	+	Difusión en agar	Singh <i>et al.</i> , 2014
<i>B. magaterium</i>										+	Difusión en agar	Sridevi <i>et al.</i> , 2011
<i>S. aureus</i>								+		+	Difusión en agar	Sridevi <i>et al.</i> , 2011
								+			Sin especificar	Sanabria-Galindo <i>et al.</i> , 1998
					-	-			+		Microdilución en caldo	Camporese <i>et al.</i> , 2003
								+		+	Difusión en agar	Singh <i>et al.</i> , 2014
									+		Microdilución en caldo	Yasunaka <i>et al.</i> , 2004
<i>P. vulgaris</i>										+	Difusión en agar	Sridevi <i>et al.</i> , 2011
<i>P. auriginosa</i>					-	-			+		Microdilución en caldo	Camporese <i>et al.</i> , 2003
<i>Enterococcus faecalis</i>					-	-			-		Difusión en agar	Camporese <i>et al.</i> , 2003

C: planta completa; H: hojas; T: tallos; F: flores. Extracto: Hx: hexánico; CF: Clorofórmico; ACT: acetónico; EtOH: etanólico; MeOH: metanólico; Ac: acuoso. Signo (+) indica efecto antibacteriano; signo (-) indica que no hay efecto sobre la cepa; espacios en blanco indican falta de estudios.

IV. JUSTIFICACIÓN

Con la creciente demanda de medicamentos en todo el mundo, el estudio de las plantas medicinales resulta ser el precursor del desarrollo de fitomedicamentos, fármacos con menores efectos secundarios y con una mayor actividad biológica frente a microorganismos que han adquirido resistencia a los fármacos sintéticos. Ello representa una manera de aumentar el acceso a la salud a nivel mundial, pues se podrían disminuir los costos de producción al prescindir del aislamiento y concentración de sustancias debido al efecto sinérgico de los compuestos.

De esta forma el conocimiento tradicional puede ser rescatado y aprovechado, pues es el resultado de siglos de observación y experimentación.

Es por ello que este trabajo de investigación parte de los registros etnobotánicos de la bayetilla, teniendo como fundamento el uso tradicional (recolección, preparación y dosis) de los extractos acuosos para contrarrestar las afecciones cutáneas causadas por bacterias.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el uso tradicional de la bayetilla *H. patens* Jacq. para el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por las bacterias más comunes.

Objetivos particulares:

- a) Determinar si existe actividad antibacteriana en extractos acuosos de hojas y de tallos de *H. patens* Jacq. frente a los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aureoginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Streptococcus pyogenes*, principales causantes de enfermedades cutáneas.
- b) Identificar la mínima concentración inhibitoria (MCI) de los extractos acuosos de hojas y de tallos.
- c) Hacer un análisis cromatográfico del extracto con actividad antibacteriana para determinar si la inhibición bacteriana es debida a la presencia de alcaloides y/o flavonoides.
- d) Identificar la naturaleza química de los componentes presentes en los extractos con actividad antibacteriana a través de un autobiograma.
- e) Relacionar los resultados obtenidos con los alcaloides y/o flavonoides descritos en *H. patens* Jacq.

VI. MÉTODO

1. Consulta de herbarios y mapa de distribución.

Se realizó una exhaustiva revisión de 562 ejemplares en cuatro de los siete herbarios de nuestro país donde se encuentra la especie en cuestión: M.E.X.U; F.C.M.E; IMSS y ENCB.

Utilizando como referencia las localidades colecta, se elaboró un mapa de distribución utilizando el software ArcMap 10.1.

2. Colecta.

La colecta de partes aéreas de la planta se llevó a cabo en mayo de 2012 en los municipios de Chapulhuacán en el Estado de Hidalgo (Localidad Cerro Boludo; 21°10'11.9"N; 98°54'04.6W; 890 m.s.n.m.) y Tamazunchale en el Estado de San Luis Potosí (Localidad El Purgatorio 21°12'19.4"N; 98°53'56.2"W; 606 m.s.n.m. y 21°13'10.0"N; 98°53'52.3"W; 528 m.s.n.m.).

3. Preparación de extractos acuosos: decocción.

El material vegetal fue secado a la sombra y molido manteniendo por separado tallos y hojas. La preparación de extractos se realizó a partir de la extrapolación de la concentración utilizada tradicionalmente: se pesaron 10 g de material vegetal y se colocaron en 300 mL agua destilada a punto de ebullición durante 5 minutos. Pasado el tiempo se dejó enfriar y se filtró. El líquido obtenido se deshidrató por liofilización y se conservó a -20°C en ultracongelador REVCO.

4. Ensayo *in vitro*.

Se realizaron ensayos por microdilución en caldo por triplicado para cada cepa en dos ensayos independientes en microplacas estériles de 96 pozos (Coyle, 2005; CLSI, 2012). Se utilizaron 12.8 mg de los extractos liofilizados disueltos en 0.8 mL de agua destilada estéril (volumen mínimo necesario para disolver el liofilizado). Cada uno de los extractos fue utilizado en una concentración inicial de $1.6E^4$ $\mu\text{g/mL}$ con un factor de dilución 2 (agregando 0.1 mL de la concentración previa a 0.1 mL de caldo nutritivo del siguiente pozo). Resultando en 12 concentraciones: $1.6E^4$; $8.0E^3$; $4.0E^3$; $2.0E^3$; $1.0E^3$; $5.0E^2$; $2.5E^2$; $1.25E^2$; $6.3E^1$; $3.1E^1$; $1.6E^1$; 7.8 $\mu\text{g/mL}$.

De igual manera se hizo con los antibióticos control: levofloxacino y amoxicilina, agregando en cada caso 100 mg de antibiótico puro en polvo en 0.650 mL de agua destilada estéril (Orhan *et al.*, 2010), realizando 23 diluciones sucesivas con factor de dilución 2. De forma que se probaron 24 concentraciones para dichos antibióticos: $1.5E^5$; $7.7E^4$; $3.8E^4$; $1.9E^4$; $9.6E^3$; $4.8E^3$; $2.4E^3$; $1.2E^3$; $6.0E^2$; $3.0E^2$; $1.5E^2$; $7.5E^1$; $3.8E^1$; $1.9E^1$; 9.4 ; 4.7 ; 2.3 ; 1.2 ; $5.9E^{-1}$; $2.9E^{-1}$; $1.5E^{-1}$; $7.3E^{-2}$; $3.7E^{-2}$; $1.8E^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$.

En cada caso se utilizó una sola cepa bacteriana por microplaca (las cepas fueron proporcionadas por el Q. F. B. Alejandro Camacho, responsable del cepario de la Facultad de Química de la UNAM). Las cepas utilizadas fueron *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* CFQ-B-89, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. pyogenes* CFQ-B-220, y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, elegidas bajo las recomendaciones para la realización de pruebas de susceptibilidad bacteriana o pruebas de actividad antibacteriana (susceptibility test or antibacterial test) (ATCC, 2014). Cada cepa fue reactivada realizando 3 resiembras en caldo nutritivo BIOXON®. Todo la cristalería utilizada fue esterilizada a 118°C por 18 minutos a 1.2 atm de presión en autoclave. Las microplacas fueron desinfectadas con alcohol de 70° y bajo luz UV durante 5 minutos. En cada caso los inóculos se estandarizaron a McFarland 0.5 correspondiente a 10^8 UFC/mL, del cual se tomaron 80 μL y se adicionó con 20 μL de cloruro de 2,3,5-

trifenil tetrazolio (TTC) al 0.05 % como indicador redox de metabolismo bacteriano. La mínima concentración inhibitoria (MCI) se determinó mediante una observación visual, donde la actividad farmacológica antibacteriana del extracto corresponde a la ausencia de coloración en el pozo, y la presencia de un compuesto rojizo corresponde a la formación de formazán como consecuencia de la reducción del TTC por el metabolismo bacteriano (Bochner, 1989) (Anexo 1). En cada caso la presencia o ausencia de formazán se determinó comparando con los controles de color .

Finalmente se comprobó el resultado haciendo una resiembra con 50 μ L del contenido de los pozos en 3 mL, de caldo estéril, se incubó a 37° por 24 hrs y se hizo una observación visual de turbidez, reportándose como inhibición bacteriana cuando no hubiera incremento en la turbidez.

5. Análisis cromatográfico.

El extracto acuoso de hojas fue separado a través de una cromatografía en capa preparativa bidimensional (utilizando gel de sílice como fase estacionaria). La primera dimensión fue corrida utilizando la fase móvil butanol, ácido acético y agua (BAW) (4:1:4) y la segunda dimensión se corrió usando como fase móvil metanol. El extracto acuoso de tallos fue separado utilizando en la primera dimensión BAW (10:1:6); y en la segunda dimensión BAW (5:2:5), cada placa fue analizada bajo luz Ultra Violeta (UV) a 365nm. En cada caso se colocaron $1E^4$ μ g/mL de extracto acuoso.

Posteriormente, se utilizaron métodos colorimétricos para comprobar la presencia de los metabolitos de interés: las placas fueron reveladas para alcaloides utilizando el reactivo de Dragendorff (Harbone, 1984) y para flavonoides usando cloruro de aluminio ($AlCl_3$) (Chang *et al.*, 2002) (ANEXO 1).

6. Autobiograma.

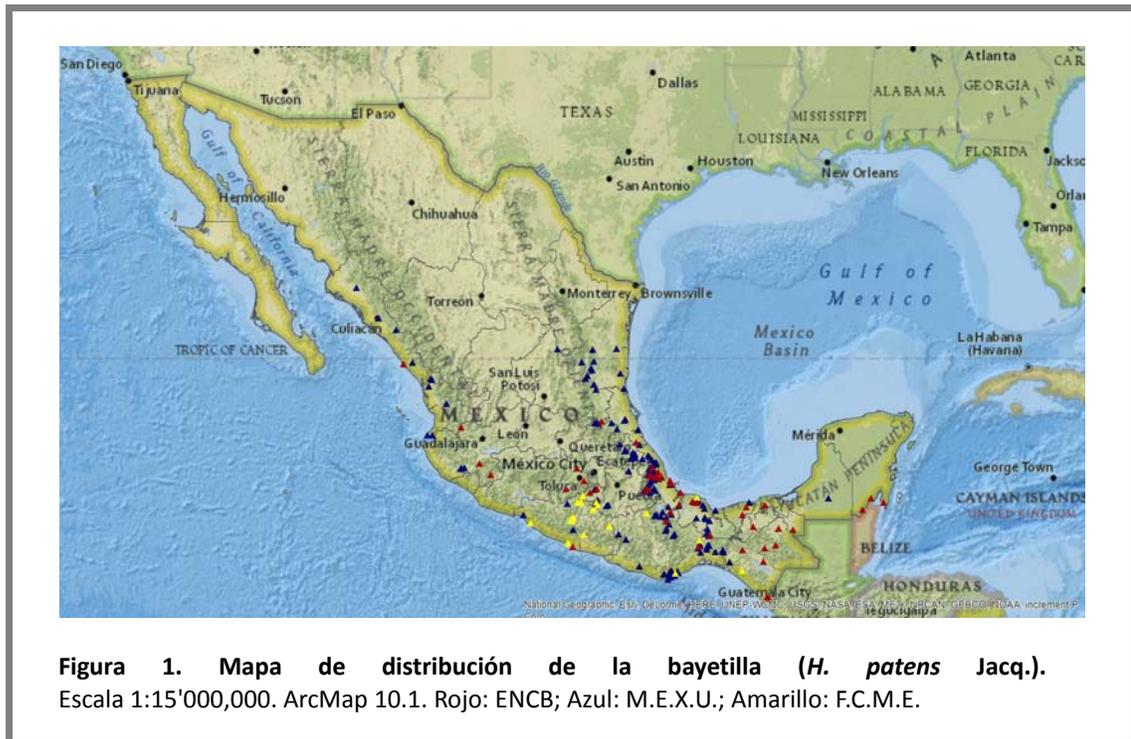
Se repitió el procedimiento para la cromatografía en placa preparativa para los extractos acuosos de hojas y de tallos, pero esta vez no se usaron reactivos reveladores. Las dos placas cromatográficas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 días con la finalidad de eliminar los solventes utilizados para la cromatografía. Posteriormente se esterilizaron bajo luz UV durante 15 minutos. A continuación, la cromatoplaque con extracto de tallos fue inoculada con *S. aureus* y la cromatoplaque con extracto de hojas con *K. pneumoniae*, bacterias que resultaron susceptibles a los extractos en el ensayo *in vitro*.

Las placas se inocularon de la siguiente manera: se agregó a cada placa 10 mL de inóculo bacteriano ajustado a McFarland 0.5 con caldo nutritivo adicionado con 2.5 mL de TTC 0.05 % m/v. La aplicación se realizó lentamente con la placa horizontal. Cada placa fue colocada en cajas Petri de 20 cm con algodón estéril húmedo y sellada con parafilm. Las placas se incubaron durante 24 hrs. Pasado el tiempo se observó y se incubó 24 hrs más con la finalidad de diferenciar el efecto bacteriostático del efecto bactericida de ambos extractos. Dicha prueba se realizó por duplicado y utilizando como control positivo placas de gel de sílice estériles e impregnadas con caldo nutritivo y TTC (0.05 %), y placas inoculadas con cada cepa por separado y adicionadas con TTC.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Mapa de distribución.

El análisis de la distribución nacional de la especie fue basado en los datos de colecta obtenidos de 562 ejemplares, dicho análisis muestra que la bayetilla se distribuye en los Estados de Campeche, Chiapas, Colima, Durango, México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas. Siendo Veracruz el Estado con mayor número de colectas



Se depositó un ejemplar de la especie en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el N°. de registro 15,883.

2. Extractos vegetales y rendimiento.

El extracto consistió en una decocción debido a que es el procedimiento de preparación más frecuente con base en los estudios etnobotánicos de la especie (Cuadro 4).

El rendimiento obtenido de la decocción de tallos resultó ser casi el doble del rendimiento obtenido del extracto de hojas (15.1 y 8.4 %, respectivamente). Cabe señalar que no se realizaron procedimientos de desengrasado de los órganos vegetales previo a la elaboración de extractos como en otros estudios de la especie (Jiménez-Suárez, 2001), ya que se buscó reproducir el procedimiento tradicional de preparación de la decocción.

Cuadro 7. Rendimientos de los extractos acuosos de <i>H. patens</i>		
Extracto acuoso	Masa seca inicial (g)	Rendimiento (%)
Tallos	10	15.13
Hojas	10	8.35

3. Ensayo de actividad antibacteriana *in vitro* por el método de microdilución en placa.

Las cepas bacterianas que presentaron susceptibilidad a los extractos acuosos de hojas y de tallos fueron *K. pneumoniae* y *S. aureus* (Cuadro 8) (ANEXOS 2).

Cuadro 8. Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> por el método de microdilución en placa.				
Cepa	Concentración de extracto con actividad antibacteriana [µg/mL]		Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) [µg/mL]	
	tallos	Hoja	Levofloxacino	Amoxicilina
<i>B. subtilis</i>	-	-	1.9E ⁴	7.74E ⁴
<i>E. coli</i>	-	-	9.6E ³	1.53E ⁵
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	1.25E ²	7.5E ¹	4.8E ³
<i>S. aureus</i>	4E ³	-	4.8	>1.53E ⁵
<i>S. epidermidis</i>	-	-	9.4	9.6E ³
<i>S. pyogenes</i>	-	-	6E ²	>1.53E ⁵
<i>P. aureoginosa</i>	-	-	1.8E ⁻²	9.6E ³

El extracto de hojas resultó activo a una concentración de 1.25E² µg/mL inhibiendo el crecimiento de *K. pneumoniae* después de 24 h de incubación respecto al control negativo de actividad. Comparando la MCI del extracto acuoso de hojas frente a la MCI del antibiótico levofloxacino para la misma cepa [7.5E¹ µg/mL], el extracto resultó activo en una concentración mayor, es decir, el efecto antibacteriano de dicho extracto no resultó ser mayor efecto al producido por el levofloxacino. Sin embargo, comparando la MCI del extracto acuoso de hojas con la MCI de la amoxicilina [4.8E³ µg/mL], se encuentra que dicho extracto es activo contra *K. pneumoniae* a una menor concentración.

De forma similar, el extracto acuoso de tallos mostró una MCI de 4E³ µg/mL frente a *S. aureus*, siendo esta concentración mil veces mayor a la producida por el levofloxacino [4.7 µg/mL]. En el caso del control positivo de inhibición con amoxicilina, dicho antibiótico no logró inhibir el crecimiento de *S. aureus* con la máxima concentración probada [1.53 µg/mL].

Valores bajos de MCI indican una alta efectividad de los extractos frente a las cepas en cuestión (Angeh, 2006), de manera que el extracto acuoso de hojas resultó tener una mayor efectividad frente a *K. pneumoniae* [$1.25E^2$ µg/mL], respecto a la efectividad que presentó el extracto acuoso de tallos frente a *S. aureus* [MCI de $4E^3$ µg/mL], en ambos casos los extractos superaron la efectividad de la amoxicilina pero no lograron ser más efectivos que el levofloxacino.

Con base en los registros de actividad antibacteriana *in vitro* (Cuadro 6), todos los extractos acuosos de tallos y de hojas de *H. patens* han resultado activos contra alguna de las cepas que se han probado en ensayos anteriores sin importar el método empleado. Y nueve de los diez ensayos que se han realizado con extractos de estos órganos vegetales empleando solventes con una polaridad igual o mayor al metanol, han resultado activos frente a distintas cepas bacterianas, esto apoya los resultados aquí presentados (Cuadro 8).

Camporese y colaboradores (2003), demostraron un efecto antibacteriano de extractos metanólicos de hojas de la Bayetilla en cepas de *E. coli* y de *P. Aeruginosa* (Cuadro 6). Si bien la polaridad del metanol permite la extracción de alcaloides y flavonoides de manera similar a la extracción acuosa (Sharapin, 2000), en el caso de *E. coli*, los resultados obtenidos en el presente trabajo no mostraron efecto antibacteriano como ocurrió en los ensayos de Camporese y colaboradores [MCI: $2.5E^3$ µg/mL], ello pudo deberse a que se en este ensayo se utilizó una cepa de *E. coli* distinta a la utilizada por Camporese y colaboradores. Sin embargo, en el caso de *P. aeruginosa* ACTT 27853, se trató de la misma cepa empleada en ambos trabajos, de esta forma la inhibición podría deberse a la presencia de metabolitos distintos en las hojas recolectadas debido a los diferentes ambientes de colecta (Schulz *et al.*, 2001), incluyendo factores climáticos y agroecológicos.

Orhan y colaboradores (2010) realizaron ensayos *in vitro* y determinaron las MCI's de levofloxacino como antibiótico control en ensayos de microdilución. Los resultados que obtuvieron fueron: *E. coli* ATCC

25922 y *K. pneumoniae* RSKK 574 [$MCI_{\text{levofloxacino}} : <1.2 \text{ E}^{-1} \mu\text{g/mL}$]; *P. aeruginosa* ATCC 10145 [$MCI_{\text{levofloxacino}} : <1 \mu\text{g/mL}$]; y *S. aureus* ATCC 25923 [$MCI_{\text{levofloxacino}} : 2.5 \text{ E}^{-1} \mu\text{g/mL}$]. A pesar de tratarse de cepas distintas a las utilizadas en este trabajo, todas resultaron ser inhibidas por el levofloxacino a diferentes concentraciones respaldando los resultados aquí presentados (Cuadro 8). Además, Orhan y cols. reportan que las concentraciones de levofloxacino utilizadas en sus ensayos [de $5.12 \text{ E}^2 \mu\text{g/mL}$ a 1.2 E^{-1}] no resultaron ser capaces de inhibir el crecimiento en *B. Subtilis* ATCC 6633, misma cepa utilizada en este trabajo de tesis. Ello se debió a que la MCI de levofloxacino que resultó activa (Cuadro 8) fue mayor a las utilizadas por Orhan y cols.

Respecto a los órganos vegetales utilizados, el tipo de extracto, el método de prueba y las cepas bacterianas elegidas para el ensayo representan un trabajo complementario a los estudios previos realizados *in vitro* para *H. patens*, pues no se encuentran en trabajos anteriores (Cuadro 6).

En un estudio previo, se reportó que a través de la técnica de difusión en agar los extractos acuosos de tallo y corteza resultaron activos *in vitro* contra: *B. subtilis* MTCC 2423 desde los $8 \text{ E}^2 \mu\text{g/mL}$ hasta los 2.5 mg/mL [$2.5 \text{ E}^3 \mu\text{g/mL}$]; *E. coli* MTCC 1652 a concentraciones que van desde los $6^2 \mu\text{g/mL}$ hasta los 2.5 mg/mL [$2.5 \text{ E}^3 \mu\text{g/mL}$] y *S. aureus* MTCC 96 desde los $8 \text{ E}^2 \mu\text{g/mL}$ hasta los 1.5 mg/mL [$1.5 \text{ E}^3 \mu\text{g/mL}$], (Singh, *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en este ensayo fueron distintos debido a que no se trata de las mismas cepas utilizadas por Singh y colaboradores (Cuadro 6).

K. pneumoniae y *S. aureus* son algunas de las bacterias implicadas en el padecimiento cutáneo denominado impétigo, siendo éste el padecimiento cutáneo causado por bacterias más frecuente (Cuadro 1 y 2). De manera similar, *S. aureus* es la cepa causante de la mayoría de los padecimientos cutáneos (Cuadro 2). Con base en los resultados obtenidos del ensayo de microdilución, la aplicación tópica de los extractos acuosos de hojas y de tallos de forma tradicional, podría ser válida para el tratamiento del impétigo.

4. Análisis cromatográfico.

Los reveladores químicos específicos para la detección de flavonoides y alcaloides, dieron resultados positivos, es decir, se detectó la presencia de ambos grupos químicos en la composición de los extractos acuosos procedentes de tallos y de hojas.

Cuadro 9. Resultados de las pruebas colorimétricas para metabolitos secundarios: alcaloides y flavonoides.		
Extracto	Prueba para flavonoides (AlCl₃)	Prueba para alcaloides (Dragendorff)
Hojas	+	+
Tallos	+	+

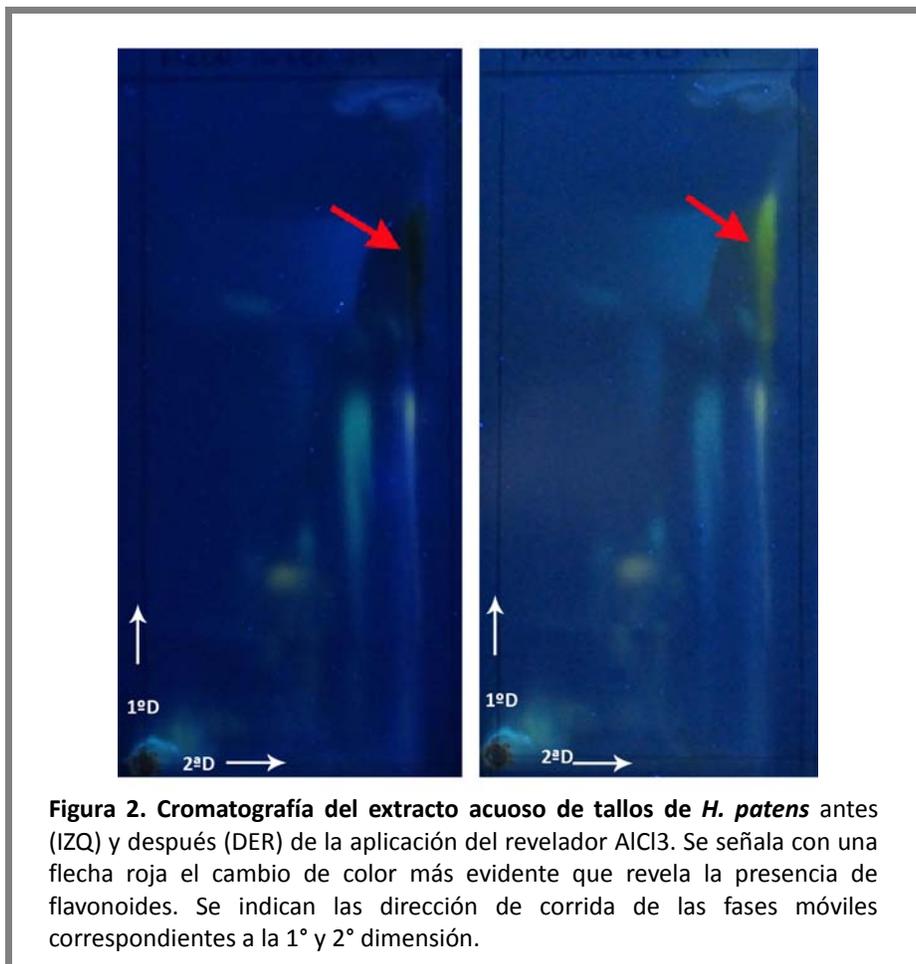
Signo (+) indica presencia del metabolito

Las pruebas colorimétricas realizadas a los extractos acuosos de hojas y de tallos indicaron la presencia de flavonoides y alcaloides, ambos compuestos son solubles en agua (Harborne, 1984), por lo que pueden estar presentes en el extracto acuoso obtenido tradicionalmente por decocción.

Reconocimiento de flavonoides: extracto de tallos

Si bien no hay registros fitoquímicos de extracción acuosa de flavonoides utilizando exclusivamente los tallos de *H. patens*, la prueba para flavonoides resultó positiva. Trabajos de investigación previos señalan que los extractos metanólicos de las partes aéreas de *H. patens* contienen flavonoides tales como la narirutina (naringenin-7-O-rutiósido), que es una flavonona glicosilada, y la rutina (quercetina 3-rutinósido) que es un flavonol (Cuadro 5). La presencia de flavonoides en el extracto acuoso de tallos resultó positiva (Fig. 5), esto indica que fue posible su extracción utilizando la técnica de decocción acuosa. Debido a la

semejanza en el grado de polaridad entre el metanol y el agua (Sharapin, 2000), no se descarta la presencia de narirutina y rutina en dicho extracto.

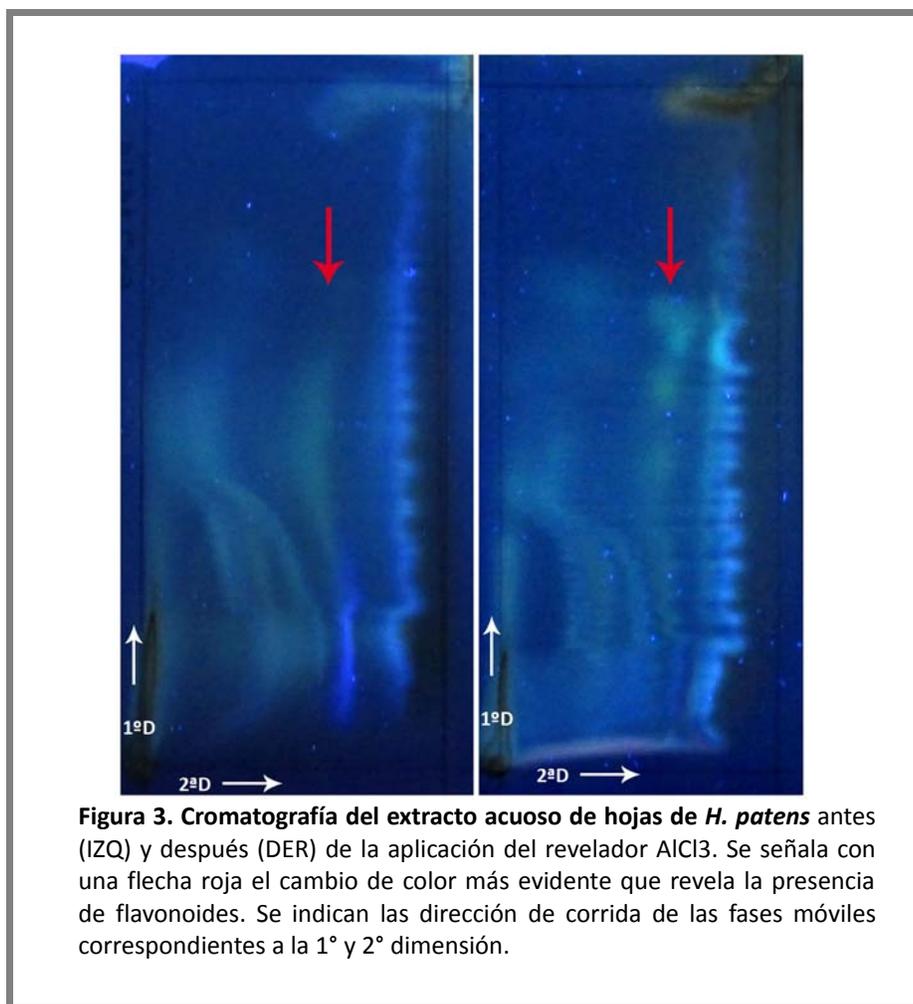


Reconocimiento de flavonoides: extracto de hojas

Al igual que en el extracto de tallos, en el extracto acuoso de hojas de *H. patens* se reveló la presencia de flavonoides con $AlCl_3$ (Fig. 6).

Jiménez-Suárez (2001) en su estudio de caracterización fotoquímica, reporta la presencia de flavonoides en extractos etanólicos de hojas, adicionalmente, Ríos y Guadarrama (2006) lograron identificar

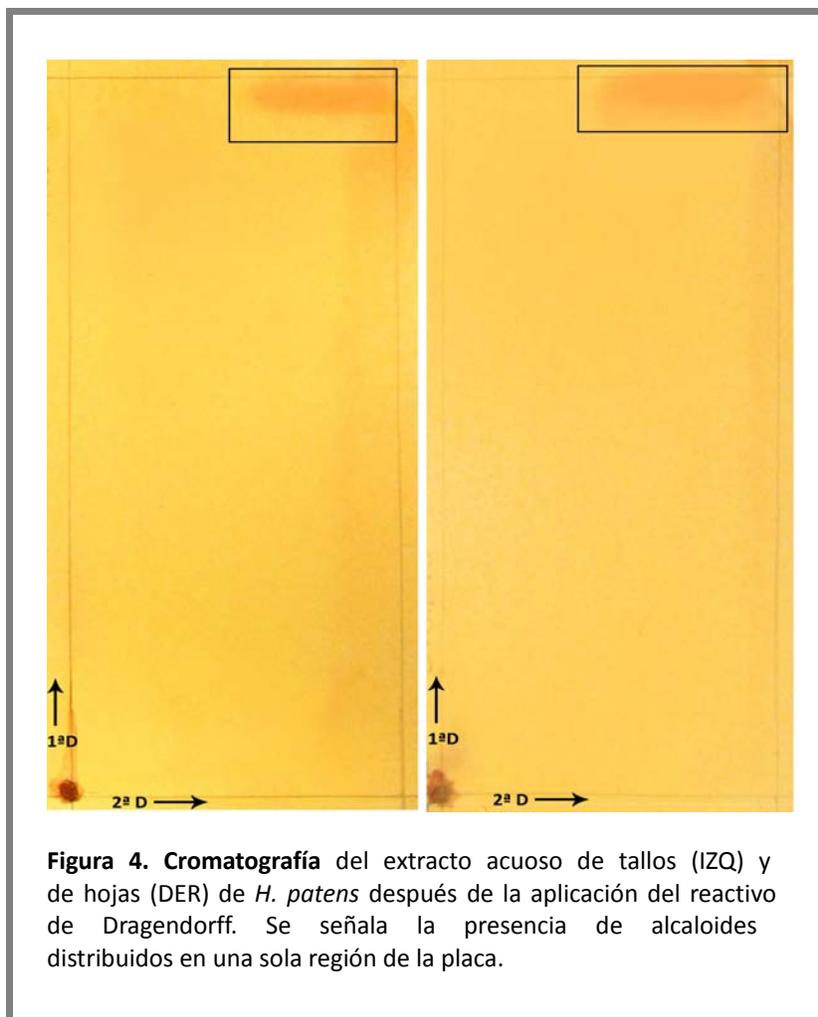
a la catequina (7-O-glucósido), un flavanol que se encuentra presente en los extractos acetónicos de hojas. Por la similitud entre las polaridades del etanol y de la acetona con la polaridad del agua, sería posible encontrar estos compuestos en el extracto acuoso de hojas realizado en este ensayo.



Reconocimiento de alcaloides: extracto de tallos y de hojas

Se determinó la presencia de alcaloides en los extractos acuosos de tallos y de hojas a través de la formación de precipitados color anaranjado (Fig. 7) al contacto con el reactivo de Dragendorff (Harborne,

1984; Marcano y Hasegawa, 2002). Es importante resaltar que en ambos casos, las bandas se sitúan en la misma posición cercana al frente de la placa cromatográfica, esto es debido a que su polaridad es la misma, así cabría la posibilidad de que se tratara del o los mismos alcaloides que se encuentran presentes tanto en los tallos como en las hojas de la especie estudiada.



De acuerdo con estudios previos en la especie, se ha demostrado la presencia de alcaloides, algunos de los cuales son tipo indólicos (cuadro 5), es decir son alcaloides derivados del aminoácido triptofano y han sido encontrados en varios géneros de la familia Rubiaceae e incluso en otras especies pertenecientes al

género *Hamelia* (Loyola-Vargas *et al.*, 2004).

La concentración de flavonoides y de alcaloides contenidos en los extractos de tallos y de hojas resultó ser suficiente para registrar su presencia con el uso de los reactivos reveladores.

5. Autobiograma.

Los resultados obtenidos a través de la técnica de autobiograma son mostrados a continuación. El extracto acuoso de tallos fue utilizado contra *S. aureus* (Fig. 8) y el extracto acuoso de hojas contra *K. pneumoniae* (Fig. 9).

Los autobiogramas realizados con los extractos de tallos y de hojas presentaron zonas bien definidas de crecimiento bacteriano determinadas por la adquisición de una coloración rojiza en presencia de TTC. También se observaron en la placa zonas sin crecimiento bacteriano, donde no se observó coloración (Fig.8 y Fig. 9).

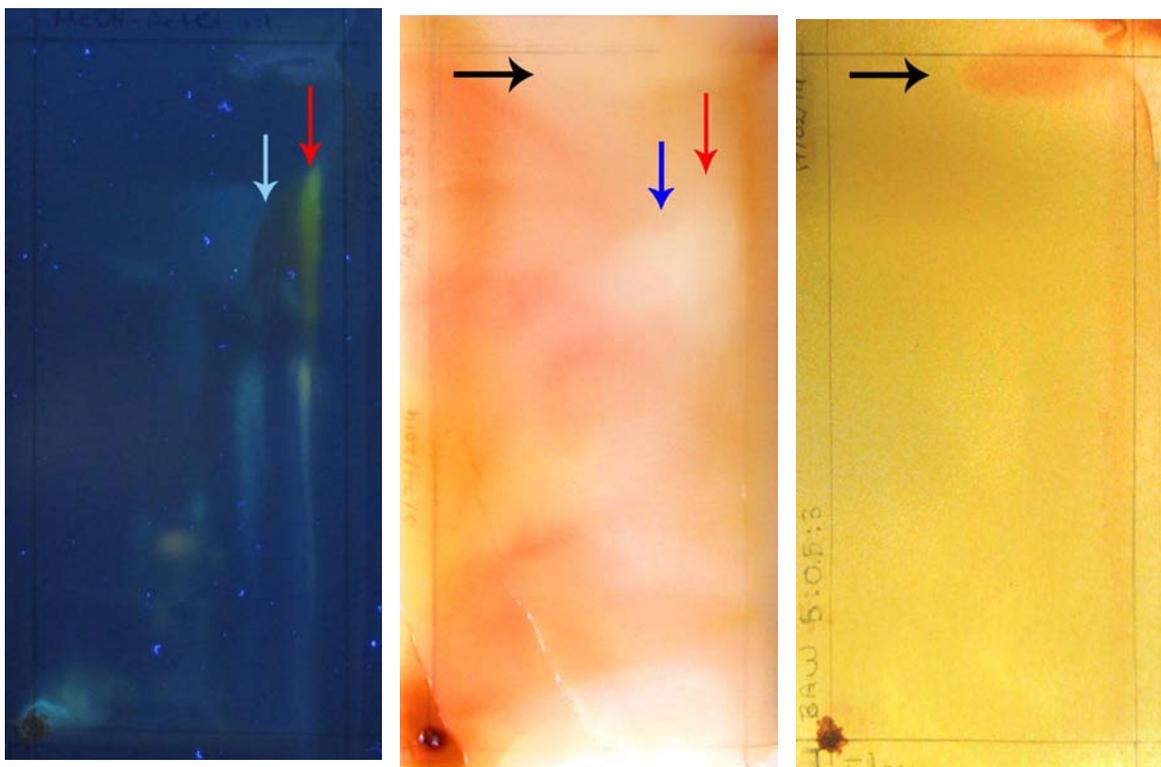
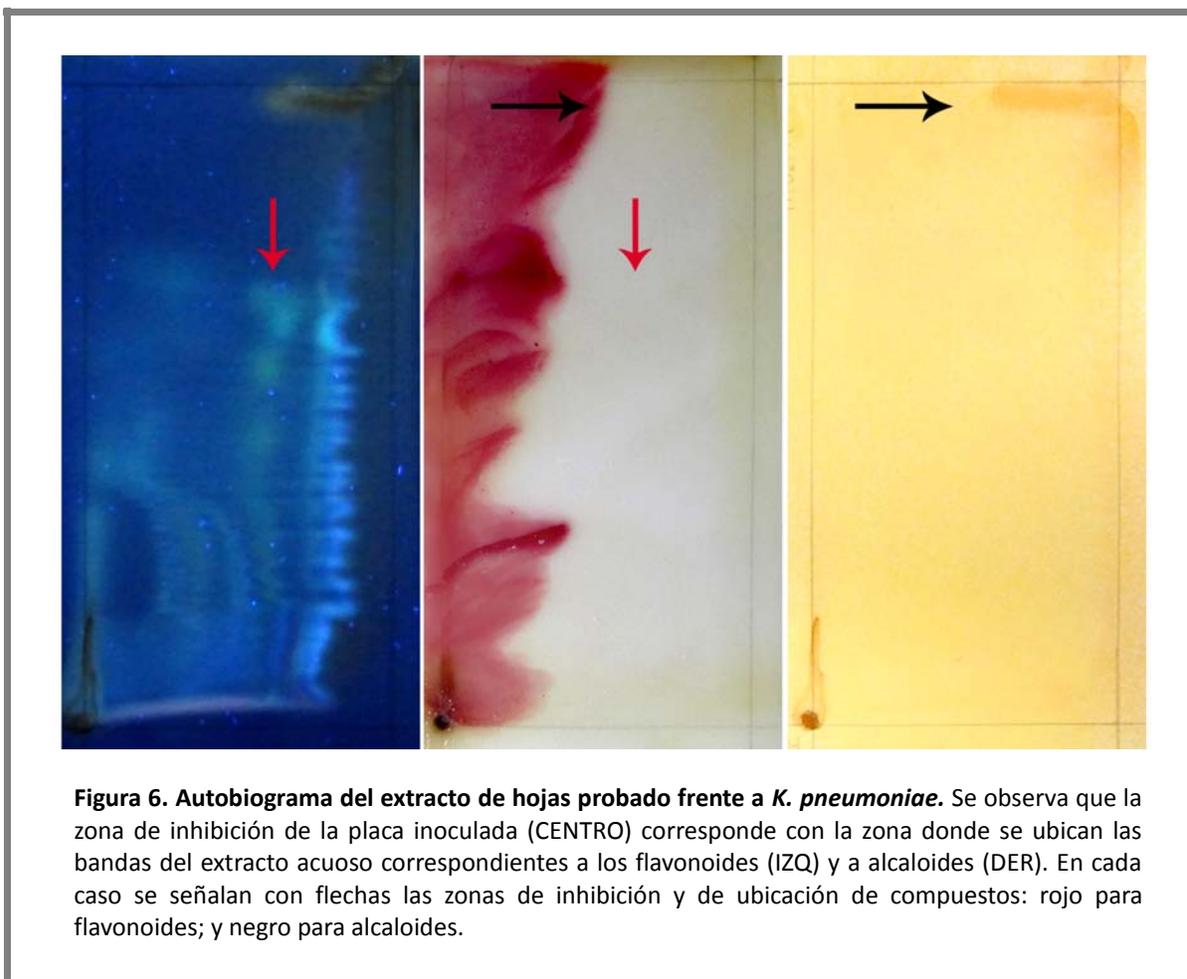


Figura 5. Autobiograma del extracto de tallos probado frente a *S. aureus*. Se observan zonas de inhibición de la placa inoculada (CENTRO) señalando con flechas las zonas donde se ubican algunas de las bandas observadas de la separación del extracto acuoso que corresponden a los flavonoides (IZQ) y a los alcaloides (DER).

Comparando estos resultados con los obtenidos en la cromatografía de dos dimensiones, la ubicación de algunos de los flavonoides y de ubicación de alcaloides, correspondió con las zonas de inhibición bacteriana. Se observa además una zona de inhibición cerca del origen de la 1°D del autobiograma correspondiente al extracto acuoso de tallos, indicando que dicha inhibición fue producida por compuestos de menor polaridad.



De manera similar a como se comparó la efectividad de los extractos acuosos de hojas y de tallos basada en la MCI registrada (Cuadro 8), es posible corroborar que la efectividad del extracto acuoso de hojas frente a *K. pneumoniae*, resultó mayor a la mostrada por el extracto acuoso de tallos frente a *S. aureus*, donde las zonas de inhibición bacteriana resultaron menos definidas que en el autobiograma de *K. pneumoniae* (Fig. 8 y Fig. 9).

Estudios previos con flavonoides aislados (rutina y catequina) que han sido identificados en *H. patens* (Cuadro 5), y que por su polaridad podrían encontrarse presentes en los extractos acuosos realizados en este trabajo (Shaparin, 2000), muestran actividad antibacteriana en ensayos *in vitro*. Pinho y colaboradores

(2014), a través del método de difusión en agar, reportan la inhibición de *S. aureus* ATCC 6538 (misma cepa empleada en este ensayo) y de *S. epidermidis* ATCC 12228 a una concentración de 5 mg/mL [$5E^3$ µg/mL] de rutina aislada de diferentes plantas en Portugal. De manera que podría estar produciendo el efecto bactericida en *S. aureus* e incluso en *K. pneumoniae*, al encontrarse la rutina en los extractos de partes aéreas.

Orhan y cols. (2010) determinaron MCI's de rutina aislada en ensayos *in vitro* en *B. subtilis* ATCC 6633 [MCI_{rutina}: 8 µg/mL], misma cepa utilizada en este trabajo de tesis. Si bien los resultados aquí presentados no mostraron susceptibilidad bacteriana en *B. subtilis* con ninguno de los dos extractos acuosos probados (Cuadro 8), la efectividad inhibitoria de la rutina en los ensayos de Orhan y cols. pudo deberse a la diferencia en las concentraciones del flavonoide aislado que fueron utilizadas, ya que en este ensayo, se desconoce su concentración en los extractos acuosos, y las MCI's aquí registradas corresponden a concentraciones del extracto herbal (Cuadro 8).

De la misma manera, Orhan y cols. (2010) determinaron las siguientes MCI's de rutina aislada: MCI_{rutina}: $1.6E^1$ µg/mL en *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* RSKK 574 y *P. aeruginosa* ATCC 10145, y MCI_{rutina}: 4 µg/mL en *S. aureus* ATCC 25923. A pesar de tratarse de cepas diferentes a las utilizadas en el presente trabajo, se demuestra con ello un efecto antibacteriano de este flavonoide.

En ensayos *in vitro* realizados con catequina aislada y probada en distintas dosis, revela su acción antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* (Sakanaka *et al.*, 1989). Además, se ha demostrado que posee actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori* con una MCI de $4E^{+2}$ µg/mL (Díaz-Gómez, 2012). Así, no se descarta la posibilidad de que produzca un efecto bactericida en *K. pneumoniae* al encontrarse en los extractos acuosos de hojas.

Los flavonoides son sintetizadas por las plantas en respuesta al ataque de microorganismos como bacterias, por ello es frecuente que presenten actividad antimicrobiana en ensayos *in vitro* (Dixon *et al.*, 1983) ello se debe posiblemente a la formación de complejos con proteínas extracelulares (Tsuchiya *et al.*, 1996), daños que afectan la membrana plasmática, impiden la síntesis de ácidos nucleicos o inhiben la energía del catabolismo (Cushnie & Lamb, 2011).

Respecto a la zona inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *K. pneumoniae* en los autobiogramas de tallos y de hojas que correspondieron con la ubicación de alcaloides en la cromatoplaqa, es necesario mencionar los estudios previos realizados con los alcaloides identificados en *H. patens*.

La isopteropodina posee una actividad antibacteriana *in vitro* frente a *S. aureus* [$1.5E^2$ µg/mL] y frente a *K. pneumoniae* [$2E^2$ µg/mL] (Cayunao *et al.*, 2014).

El resto de los compuestos que han sido identificados en *H. patens* (Glicósido 5,7,2', 5'-tetrahidroxiflavanona 7-rutinósido, narirutina, alcaloide A, palmirina, rumberina, maruquina, isomaruquina, pteropodina, tetrahidroalstonina, especiofilina, hamelina), no han sido probados de manera aislada para verificar su potencial antibiótico (NCBI, 2015).

Las dos placas se incubaron 24 h más sin mostrar cambios en las zonas de crecimiento y de inhibición, ello indica que los extractos acuosos de tallos y de hojas tienen efecto bactericida sobre *S. aureus* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

La concentración de flavonoides y de alcaloides contenidos en los extractos de tallos y de hojas, aunque no puede ser comparado con las concentraciones utilizadas en el ensayo de microdilución, si resultaron ser suficientes para producir un efecto inhibitorio sobre las cepas estudiadas.

El método para inocular la placa preparativa utilizado para la realización del autobiograma, resultó ser

bueno, al permitir una distribución homogénea y mantener un microambiente adecuado dentro de la caja Petri para el desarrollo bacteriano.

A pesar de que algunas cepas bacterianas no presentaron susceptibilidad a los extractos, no se descarta la posibilidad de un efecto terapéutico de los extractos de *H. patens* utilizados tradicionalmente en forma de decocciones, ya que dicho efecto podría ser causado de manera indirecta, con base en lo probado por Keplinger y colaboradores (1999) quien explica que los alcaloides oxindólicos, como la aricina oxindol, poseen un efecto inmunoestimulante al promover la fagocitosis de microorganismos por los macrófagos. Aunado a ello, compuestos como el ácido rosmárinico que reducen el proceso inflamatorio (Chu *et al.*, 2012) podrían favorecer la cicatrización en piel y la eliminación de los agentes patógenos involucrados en el proceso infeccioso.

VIII. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de tallos de *H. patens* presentó efecto bactericida frente a la cepa *S. aureus* a una concentración de $4E^3$ $\mu\text{g/mL}$, dicho efecto podría estar relacionado con la presencia de flavonoides con efecto antibacterial comprobado como la rutina o de alcaloides como la isopteropodina.

El extracto acuoso de sus hojas tiene efecto bactericida frente a *K. pneumoniae* a $1.25E^2$ $\mu\text{g/mL}$. La inhibición de *K. pneumoniae* por el extracto acuoso de hojas podría deberse a la presencia del flavonol catequina y/o a la rutina; y a la presencia del alcaloide isopteropodina que han sido identificados en la especie y cuya actividad antibacteriana ha sido reportada anteriormente.

Los resultados respaldan el uso tradicional de las decocciones de los las partes aéreas de la bayetilla (*H. patens* Jacq.) contra las infecciones cutáneas más comunes en México.

Los métodos de microdilución y de autobiograma empleados en el trabajo son reproducibles y resultaron adecuados para el desarrollo de las pruebas biológicas *in vitro*.

IX. PERSPECTIVAS

Es importante hacer estudios cuantitativos de los flavonoides y alcaloides presentes en diferentes órganos vegetales de esta especie, con la finalidad de determinar en cual de ellos se concentra una mayor cantidad de metabolitos y así optimizar tanto su estudio como su aplicación terapéutica.

Deben realizarse ensayos *in vitro* con cepas aisladas directamente de pacientes con infecciones cutáneas, y comparar dichos resultados con los obtenidos en cepas utilizadas para investigación.

De la misma manera se recomienda utilizar los extractos acuosos de hojas y de tallos para hacer ensayos *in vitro* en cepas bacterianas que presenten resistencia a los antibióticos más recetados, ya que si los extractos logran inhibir el crecimiento bacteriano su utilización sería una alternativa terapéutica para la infección.

Establecer las bases para el cultivo y procesamiento de esta especie que permita comparar y estandarizar el contenido de los principios activos terapéuticos (alcaloides y flavonoides).

XI. REFERENCIAS

Acero de Mesa, N.; Linares-Pinel, F. y D. Muñoz-Mingarro-Martínez. Capítulo 3: "Principios activos de las drogas vegetales. Metabolitos secundarios. Propiedades". En: Castillo-García, E. e I. Martínez-Solís. 2007. Elsevier Doyma.España.

Acosta de la Luz, L. 2003. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales 8(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008&lng=es (Mayo 2014).

Angeh, J. E. 2006. Isolation and characterization of anti-bacterial compounds present in members of *Combretum* section, Hypocreteropsis. Submitted in fulfilment of the requeriments for the degree of Doctor of Philosophy (PhD). Phytomedicine Programme, Departament of Paraclinical Sciences. Faculty of Veterinary Science. University of Pretoria. South Africa. 146pp.

Amado, S. 2001A. Capítulo 5: Dermatitis bacterianas. En: Lecciones de dermatología. 14° Edición. Méndez Editores. México. 83-210p.

Amado, S. 2001B. Lecciones de dermatología. 14° Edición. Méndez Editores. México. 783p.

American Type Culture Collection (ATCC®). 2014. The Essentials of Life Science Research. Globally Delivered. ATCC Bacteria. Disponible en: http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Bacteria/Alphanumeric_Genus_Species.aspx (Diciembre 2014).

Andoque-Andoque, H.; Andoque-Andoque, D.; Andoque-Andoque, M.; Andoque-Andoque, H. y R. Andoque-Andoque. 2009. Plantas Medicinales de la Gente de Hacha. Asociación Centro de Orientación Educativa ACOE. Colombia. 99p.

- Andrade-Cetto, A. 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México.
Ethnopharmacology 122 (1): 163-171p.
- Aquino, R.; Letizia-Ciavatta, M.; De Simone, F. & C. Pizza. 1990. A Flavanone Glycoside from *Hamelia patens*.
Phytochemistry 29(7): 2358-2360.
- Arenas, R. 2005. Dermatología: Atlas, Diagnóstico y Tratamiento. 304-370p.
- Argueta, V. A., Cano, A. J. Y M. E. Rodarte. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.
Vol.1. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. 1786pp.
- Arias-Adams, A.; Lee, E. F. & T. J. Mabry. 1989. HPLC study of oxindole alkaloids from *Hamelia patens*. Revista
Latinoamericana de Química 20: 71-72p.
- Base de Datos Etnobotánicos de Plantas de México (BADEPLAM). 2001.
<http://unibio.unam.mx/proyectos/badeplam.swf> (Noviembre 2012).
- Beyra, A.; León, M. del C.; Iglesias, E.; Ferrándiz, D.; Herrera, R.; Volpato, G.; Godínez, D.; Guimaraes, M. y R.
Álvarez. 2004. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba).
Anales del Jardín Botánico de Madrid 61(2): 185-204p.
- Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Bayetilla: *Hamelia patens* Jacq. Universidad Nacional
Autónoma de México. Disponible en:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7013> (Noviembre
2011)
- Bochner, B. 1989. "Breathprints" at the microbial level: an automated redox-based technology quickly
identifies bacteria according to their metabolic capacities. ASM News (55): 536-539p.
- Borges, J.; Manresa, M. T.; Martín-Ramón, J. L.; Pascual, C. & A. Rumbero. 1979. Two new oxindole alkaloids
isolated from *Hamelia patens* Jacq. Tetrahedron Lett 34: 3197-3200p.

- Borges, J.; Manresa, M.T.; Martín, J. L.; Rodríguez, F.; Vazquez, P. & P. Joseph-Nathan. 1982. Study of oxindole alkaloids from *Hamelia patens* Jacq. by carbon-13 NMR. *Anales de Química Serie C* 78: 126-8p.
- Caballero, J. Y L. Cortés. 2001. Percepción, uso y manejo tradicional de los vegetales de México. En: Rendón-Aguilar, B.; Rebollar-Domínguez, S.; Caballero-Nieto, J. Y Martínez-Alfaro, M. A. (Eds). *Plantas, Cultura y Sociedad. Estudio sobre la Relación entre Seres Humanos y Plantas en los Albores del Siglo XXI*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 79-100p.
- Camporese, A.; Balick, M. J.; Arvigo, R.; Esposito, R. G.; Morsellino, N.; Simone, F. De y A. Tubaro. 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology* (87): 103-17p.
- Cayunao, C.; Erazo, S.; Backhouse, N.; Bachiller, L. I.; Zaldívar, M. y R. Gracia. 2004. Estudio de la actividad antimicrobiana de un alcaloide oxindólico y actividad antioxidante de diferentes extractos de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Revista de Fitoterapia* 4 (2): 152-154p.
- Chang, C.; Yang, M.; Wen, H.; & J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10:178-182p.
- Chaudhuri, P.K.& R. S. Thakur. 1991. *Hamelia patens*: a new source of ephedrine. *Planta Medica* 57: 199-200p.
- Chu, X.; X. Ci; J. He; L. Jiang; M. Wei; Q. Cao; M. Guan; X. Xie; X. Deng; J. He. 2012. Effects of a Natural Prolyl Oligopeptidase Inhibitor, Rosmarinic Acid, on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Molecules* 2012 (17): 3586-3598p.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Ninth Edition. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-783-9 [Print]; ISBN 1-56238-784-7 [Electronic]). USA. 68pp. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf> (Febrero 2015).
- Colegate, S. M. & R. J. Molyneux. 2008. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton (8): 605 p.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2011. Estadísticas del agua en México, edición 2011. 132pp.
- Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO). 2011. Malezas de México. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/hamelia-patens/fichas/ficha.htm> (Noviembre 2011).
- Coyle, M. B. 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology & Organización Panamericana de la Salud. USA. 236 pp.
- Cushnie, T. P. T. & A. J. Lamb. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 38: 99-107p.
- Díaz, W. Y F. Ortega. 2006. Inventario de Recursos Botánicos Útiles y Potenciales de la Cuenca del Río Morón, Estado Carabobo, Venezuela. 16(1): 31-6p.
- Díaz-Gómez, R. O. 2012. Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Mención Enología. Chile. 33pp.
- Dixon, R. A.; Dey, P. M. & C. J. Lamb. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. Adv. Enzymol. (55):1-69.
- Elias, T. S. 1976. A monograph of the genus *Hamelia* (Rubiaceae). Memoirs of the New York Botanical Garden 26 (4): 81-144p.

- Grandtner, M. M. 2005. Elsevier's Dictionary of Trees. Volume 1: North America. Elsevier. 409p.
- Harborne, J. B. 1984. Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd edition. Chapman and Hall. 277pp.
- Hendriksen, R. S. 2003. MIC determination by broth dilution using Sensititre. 4th Ed. Laboratory Protocols. Global Salm-Surv. Disponible en: <http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/mic%20broth%20dilution%20sensititre%20010405,%20modified%2010-2010.pdf> (Mayo 2015).
- Horticultural Gardens in Texas A&M University. 2009. College Station. USA. Disponible en: <http://www.asergeev.com/pictures/archives/compress/2009/792/03x.htm> (Noviembre 2011).
- Jacquin, N. J. 1760. *Enumeratio systematica plantarumquas in insulis Caribaeis vicinaque Americas continente detexit nouas, aut iam cognitatas emandauit*. Lugduni Batavorum, Apud T. Haak. 44pp.
- Jiménez-Suárez, V.; Reyes-Munguía, A.; Pérez-Berúmen, C. y B. Alvarado-Sánchez. 2001. Separación Cromatográfica del Extracto de *Hamelia patens*. Revista Académica de Investigación Tlatemoani (11). Eumed. España.
- Jüttner, G. 1983. Therapeutische Konzepte and soziales Anliegen in der frühen Kräuter heilkunde. In: Imhof , A. E. (ed) Der Mensch und sein Körper. Alemania. 118-130p.
- Keplinger, K.; Laus, G.; Wurm, M.; Dierich, M. P. & H. Teppner. 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.— Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. Journal of Ethnopharmacology 64: 23-34p.
- Linares, D.; Bye R. y B. Flores. 1999. Plantas medicinales de México usos, remedios y tradiciones. Instituto de Biología. UNAM. México. 155pp.
- Loyola-Vargas, V. M.; Sánchez-Iturbe, P.; Canto-Canché, B.; Gutiérrez-Pacheco, L. C.; Galaz-Ávalos, R. L. y O. Moreno-Valenzuela. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. Journal of the Mexican Chemical Society. Vol 48 (1): 67-94p.

- Magaña-García, M. y M. Magaña-Lozano. 2011. Capítulo 4, sección II: Enfermedades bacterianas. En: Dermatología. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. México. 54-98p.
- Marcano, D. Y M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. 384p.
- Martínez-Alfaro, M. A.; Evangelista-Oliva, V.; Mendoza-Cruz, M.; Morales-García, G.; Toledo-Olazcoaga, G. Y A. Wong León. 2001. Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. Cuadernos 27. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 306p.
- Mendieta, R. M. y S. Del Amo R. 1981. Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Continental. México. 167-168p.
- Monge-Cubas, G. E. Y R. A. Salinas-Guerrero. 2009. Investigación de adulteración y/o falsificación en productos elaborados a partir de *Aloe vera* (sábila), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Hamelia patents* (chichipince), *Morinda citrifolia* (noni) *Panax quinquefolius* (ginseng americano); recolectadas en el mercado San Miguelito del municipio de San Salvador. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 154pp.
- Muñoz-García, M. C. 1999. Frecuencia de patologías en el servicio de dermatología. Tesis para obtener el diploma de especialista en medicina familiar. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 50p.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2015. PubChem Compound. Database. USA. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> (Abril 2015).
- Ocampo, R. & M. J. Balick. 2009. Plants of Semillas Sagradas: An Ethnomedicinal Garden in Costa Rica. Finca Luna Nueva Extractos de Costa Rica, S.A.52-53p.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. 65pp.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2004. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Centro de Prensa. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/index.html> (Enero 2013).
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2013. Diversidad biológica: La importancia de la biodiversidad biológica para las investigaciones sanitarias y la medicina tradicional. Cambio Climático y Salud Humana. Disponible en: <http://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/es/> (Enero 2013).
- Orhan, D. D.; B. Özçelik; Özgen, S. & F. Ergun. 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research* (165): 496-504p.
- Pinho, E.; I. C. F. R. Ferreira; L. Barros; A. M. Carvalho; G. Soares & M. Henriques. 2014. Antibacterial Potential of Northeastern Portugal Wild Plant Extracts and Respective Phenolic Compounds. *Journal of Biomedicine and Biotechnology Research International*, vol. 2014, Article ID 814590: 8 p.
- Pronativas. 2010. *Hamelia patens*. Disponible en: <http://pronativas.com/pronativas/index.php/es/component/sobi2/?sobi2Task=sobi2Details&catid=33&sobi2Id=95> (Noviembre 2011).
- Pulido-Salas, M. T. y Serralta-Peraza, L. 1993. Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones en Quintana Roo. México. 53p.
- Reyes-Chilpa, R.; Rivera, J.; Oropeza, M.; Mendoza, P.; Amekraz, B.; Jankowski, C. & M. Campos. 2004. Methanol Extracts of *Hamelia patens* Containing Oxindole Alkaloids Relax KCl-Induced Contraction in Rat Myometrium. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27(10): 1617-1620p.
- Ríos, M. Y. y A. B. Aguilar-Guadarrama. 2006. Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 11(1).

- Romo-Díaz, G. 2013. Estudio de las plantas silvestres con uso medicinal en La Encantada, municipio de Cazones de Herrera, Veracruz. Tesis para obtener el grado de Bióloga. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 36-37p.
- Rzedowski, J. 1992. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Ciencias* (6):47-56p.
- Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry* (53):2307–2311p.
- Sanabria-Galindo, A.; López, S. I. Y R. Gualdrón. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* (26): 15-19p.
- Sanabria-Galindo, A.; Mendoza-Ruiz, A. y A. L. Moreno. 1998. Actividad antimicrobiana *in vitro* de angiospermas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* (27): 47-51p.
- Schulz, V.; Hänsel, R. & V. E. Tyler. 2001. *Rational Phytotherapy: A Physicians' Guide to Herbal Medicine*. 3Th ed. Springer. Alemania. 365pp.
- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello. Colombia. 71-90pp.
- Singh, S.; Khan, MD. K.; Sharma, S. K.; L. Singh. 2014. *In vitro* Assessment of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Various Extracts of *Hamelia patens*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* VII (2): 147-153p.
- Sociedad Farmacéutica de México. 1884 . Imprenta de Francisco Díaz de León. Nueva farmacopea mexicana de la Sociedad farmacéutica de México. México. Disponible en: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1080096098/1080096098.html> (Mayo 2015).
- Sridevi, A.; Vijayalakshmi, M. & Narasimha, G. 2011. Antibacterial activity of some higher plant floral petals. *Natural Products an Indian Journal* VII (4): 168-179p.

- Stevens, W. D., C. Ulloa, A. Pool y O. M. Montiel. 2001. Flora de Nicaragua. Vol. 85, Tomo I, II y III. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, Missouri.
- Taylor, L. 2005. *Hamelia patens*. In: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals. The Healing Power of Rainforest Herbs. Tropical Plant Database. Raintree Nutrition. Disponible en: <http://www.rain-tree.com/scarletbush.htm> (Noviembre 2011).
- Tsuchiya, H.; Sato, M.; Miyazaki, T.; Fujiwara, S.; Tanigaki, S.; Ohyama, M. Tanaka, T. & M. Iinuma. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology 50:27–34p.
- Villaseñor, R., J. L. y F. J. Espinosa. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 449 pp.
- Weniger, B.; Rouzier, M.; Daguilh, R.; Foucaud, J.; Robineau, L. & R. Anton. 1986. Traditional medicine in the Central Plateau of Haiti: Study of the traditional therapeutic system in a rural socio-cultural area. Journal of Ethnopharmacology 17(1):1-11p.
- Yasunaka, K.; Fumiko, A.; Nagayama, A.; Okabe, H.; Lozada-Pérez, L.; López-Villafranco, E.; Estrada-Muñiz, E.; Aguilar, A. Y R. Reyes-Chilpa. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. Journal of Etnofarmacology 97: 293-299p.

XI. ANEXOS

1. Lista de reactivos

- **Estándar de Tubidez McFarland 0.5** (Coyle, 2005).

El patrón 0.5 de McFarland corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de *Escherichia coli* de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Fórmula aproximada por 100 mL de agua purificada

Ácido sulfúrico, 0.18 M99.5 mL

Cloruro de Bario, 0.048 M0.5 mL

- **Revelador metabólico: tetrazolio 0.05 % m/v** (Bochner, 1989).

Se disuelven 5 g de sal de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio tetrazolium en 100 mL de agua estéril (pH=7). Si el agua no se encuentra en el intervalo de neutralidad, la sal de tetrazolio debe disolverse en una solución de fosfato búfer. La solución de tetrazolio debe ser almacenada en la oscuridad.

- **Revelador de flavonoides. Cloruro de Aluminio** (Colegate & Molyneux, 2008).

Se prepara una solución de 1% v/v de AlCl_3 en etanol 70%, para visualizar las bandas de flavonoides se requiere una lámpara de luz Ultravioleta UV a 365 nm.

- **Revelador de alcaloides. Reactivo de Dragendorff** (Colegate & Molyneux, 2008).

Disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua. Dejar en reposo 24 horas, posteriormente se decanta y se afora a 100 mL. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides. Para lograr un revelado con este reactivo se debe rociar el cromatograma con él y se observan manchas naranjas o rojas en un fondo amarillo claro. En ocasiones se debe calentar el cromatograma.

2. Resultados del método de microdilución: Microplacas

- **Criterios para identificar la mínima concentración inhibitoria (MCI) con base en los patrones de crecimiento observados** (Hendriksen, 2003).

Columna 1. MIC: Pozo D

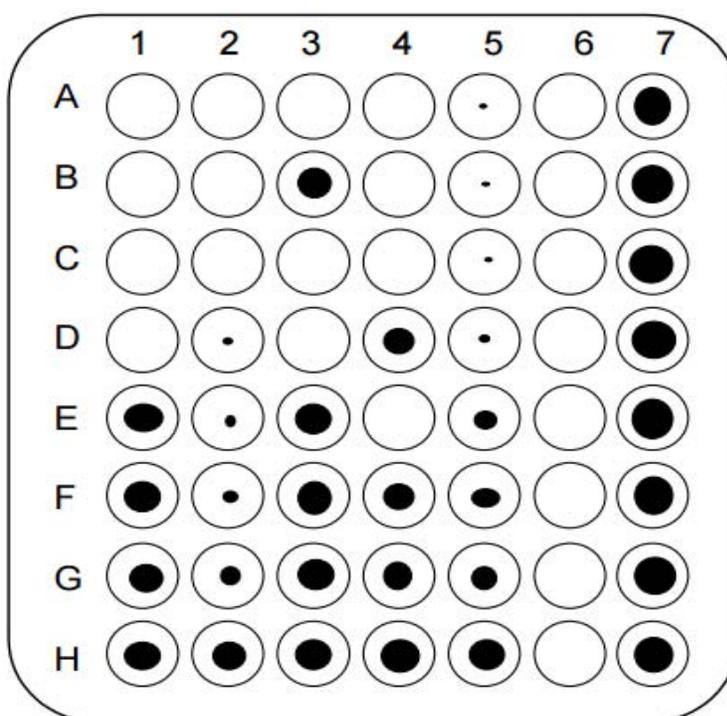
Columna 2. MCI: Pozo C

Columna 3. MCI: Pozo D

Columna 4. MCI: Pozo C

Columna 5. MCI: Pozo D

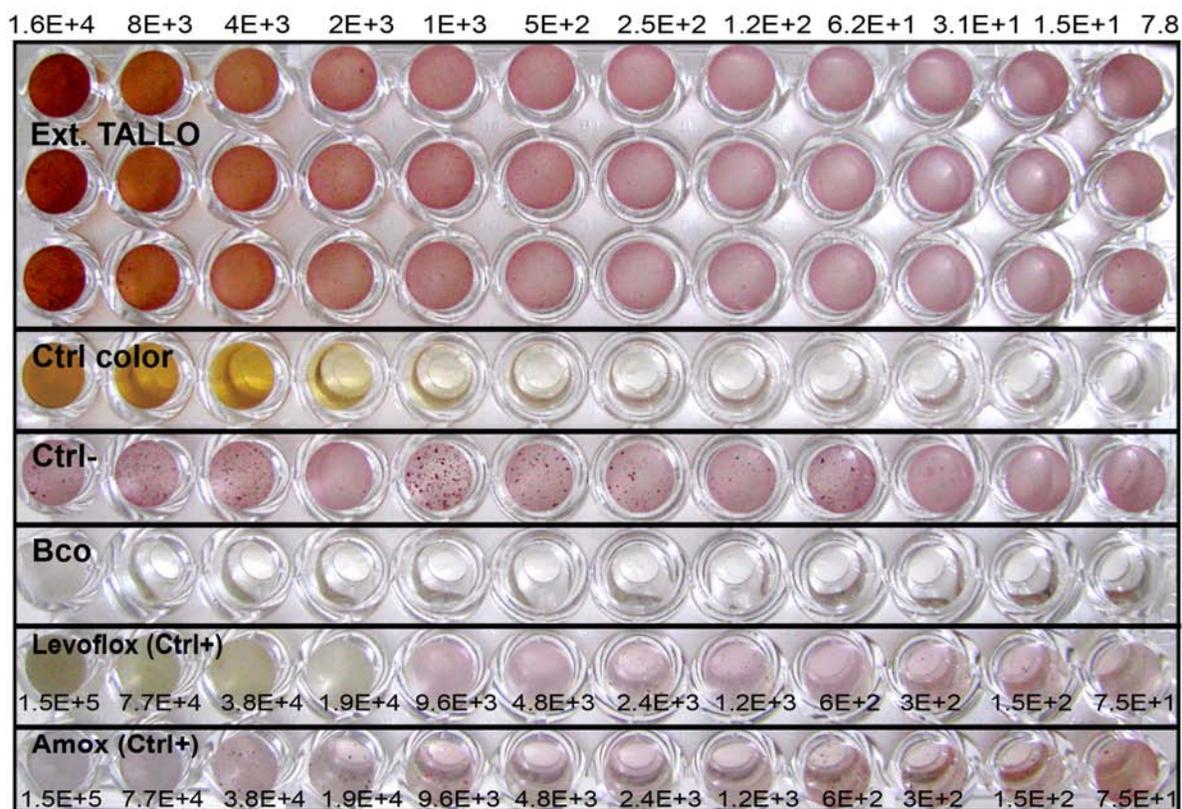
Columna 6. MCI: Igual o menor a la concentración más baja utilizada. Ej. MCI $\leq 1 \mu\text{g/mL}$



● = Crecimiento

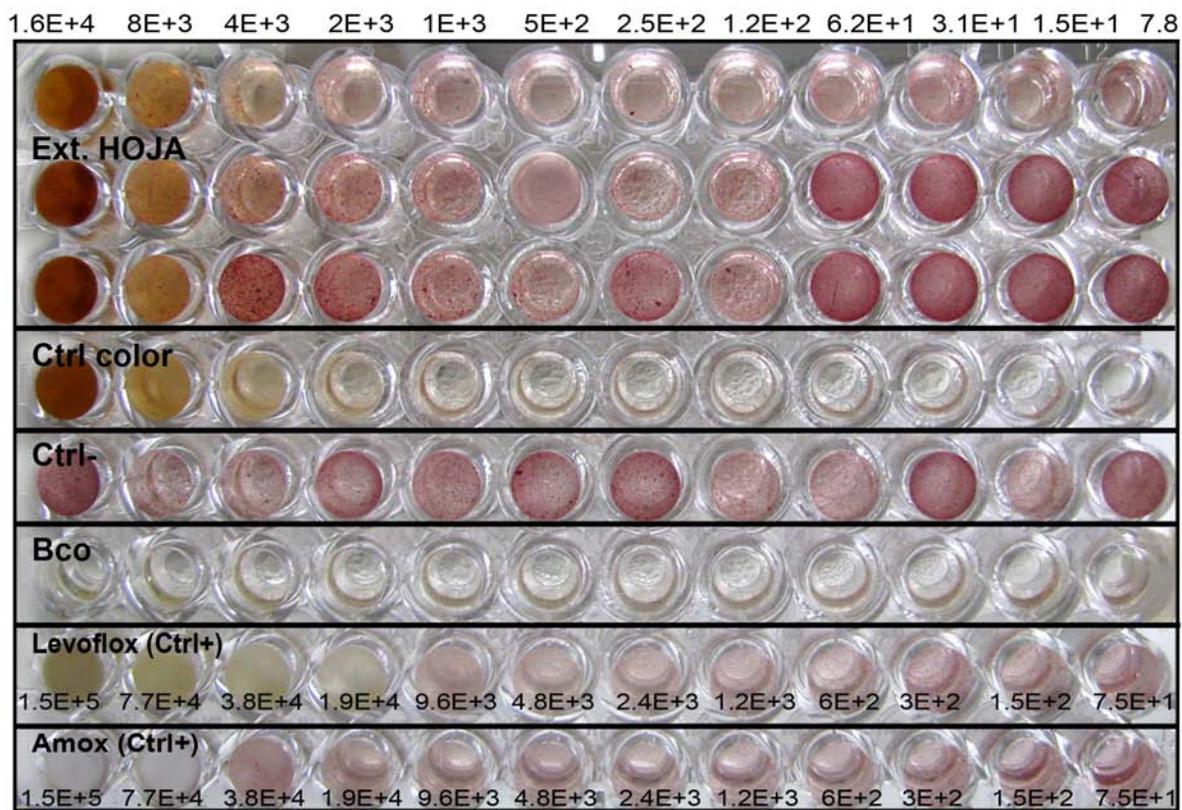
Bacillus subtilis ATCC6633. Extracto acuoso de tallos: No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: $1.9E^4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. MCI amoxicilina: $7.7E^4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$.

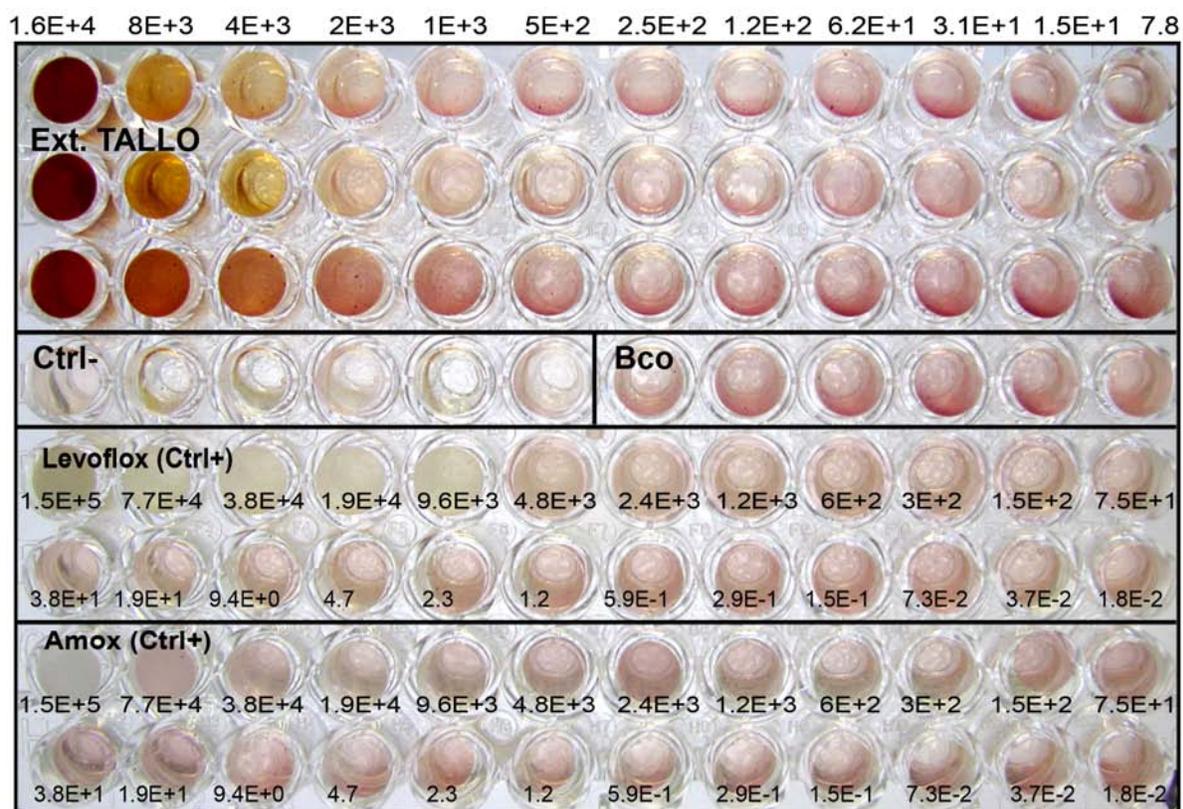


Bacillus subtilis ATCC6633. Extracto acuoso de hojas: No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: $1.9E^4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. MCI amoxicilina: $7.7E^4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$.

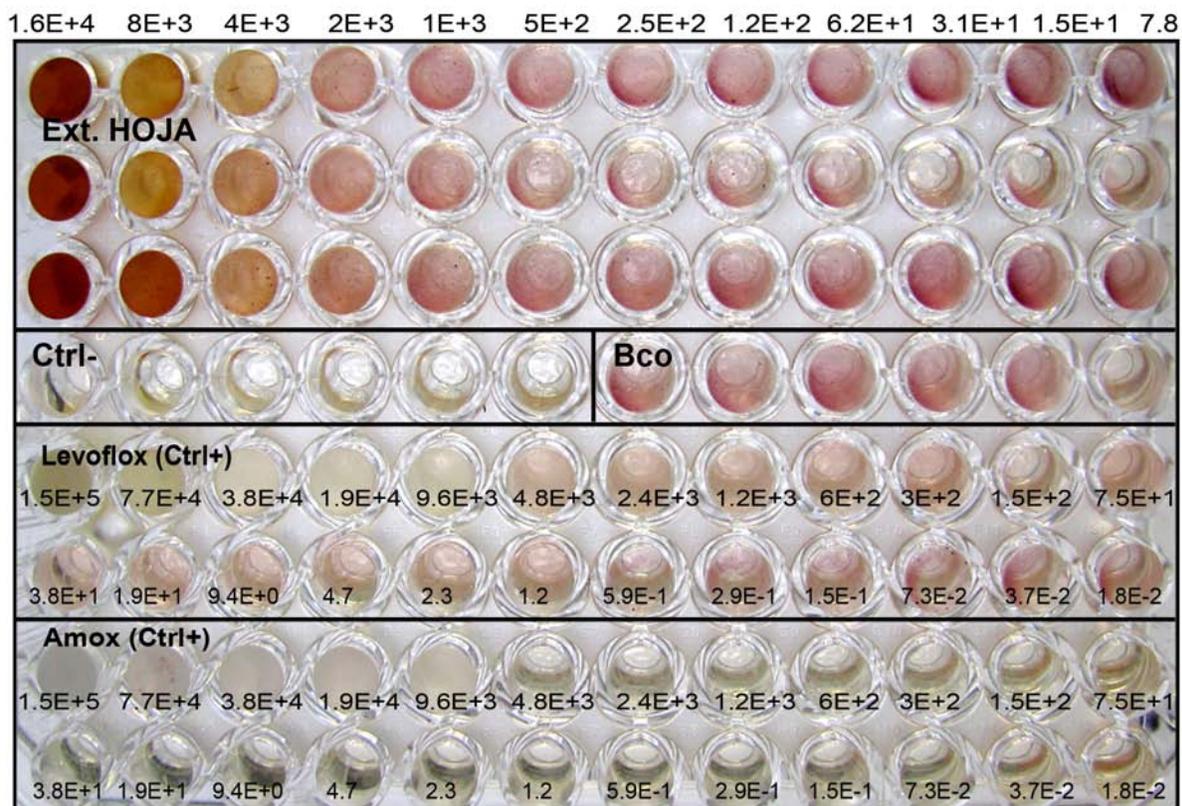


***Escherichia coli* ATCC 11229.** Extracto acuoso de tallos: No presentó actividad antibacteriana. No presentó actividad antibacteriana. MCI levofloxacino: $9.6E^3 \mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $1.5E^5 \mu\text{g/mL}$.

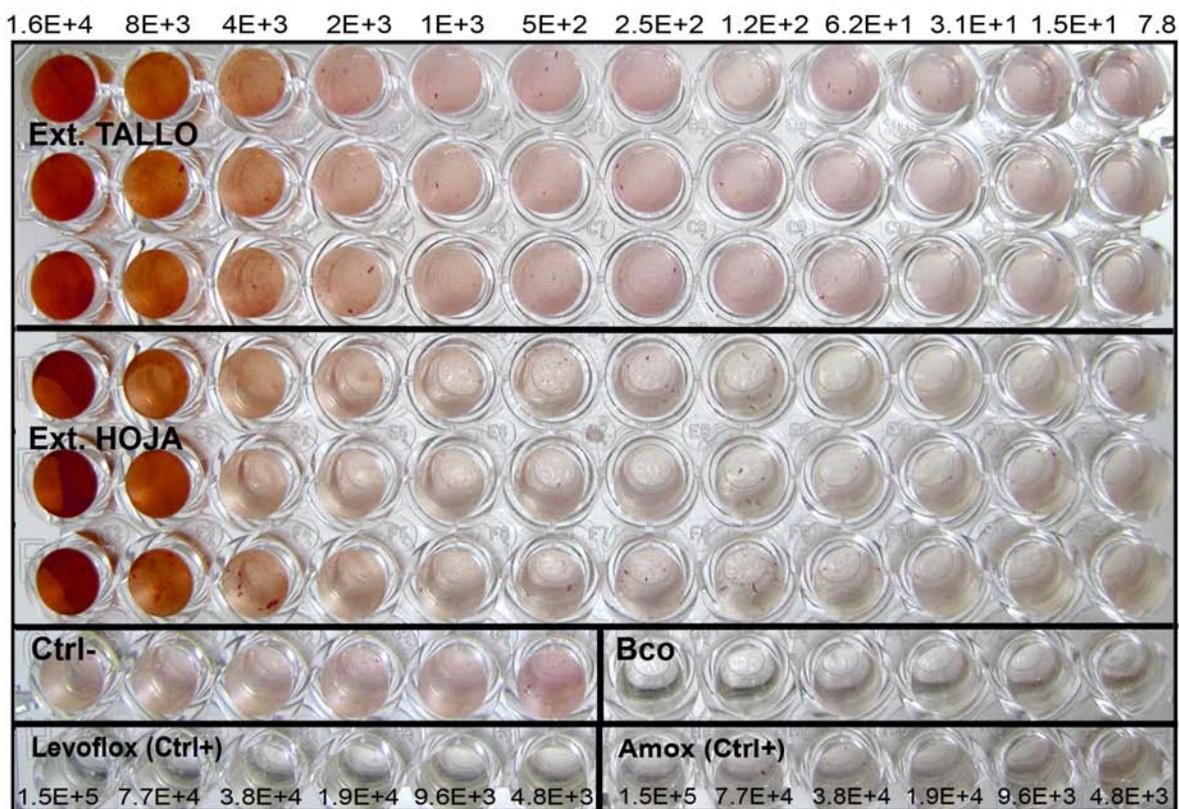


Escherichia coli ATCC 11229. Extracto acuoso de hojas: No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: $9.6E^3 \mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $1.5E^5 \mu\text{g/mL}$.



***Klebsiella pneumoniae* CFQ-B-89.** Extracto acuoso de tallos: No presentó actividad antibacteriana. Presentó actividad antibacteriana con una MCI de $1.25E^2 \mu\text{g/mL}$. MCI levofloxacino: $7.5E^1 \mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $4.8E^3 \mu\text{g/mL}$.

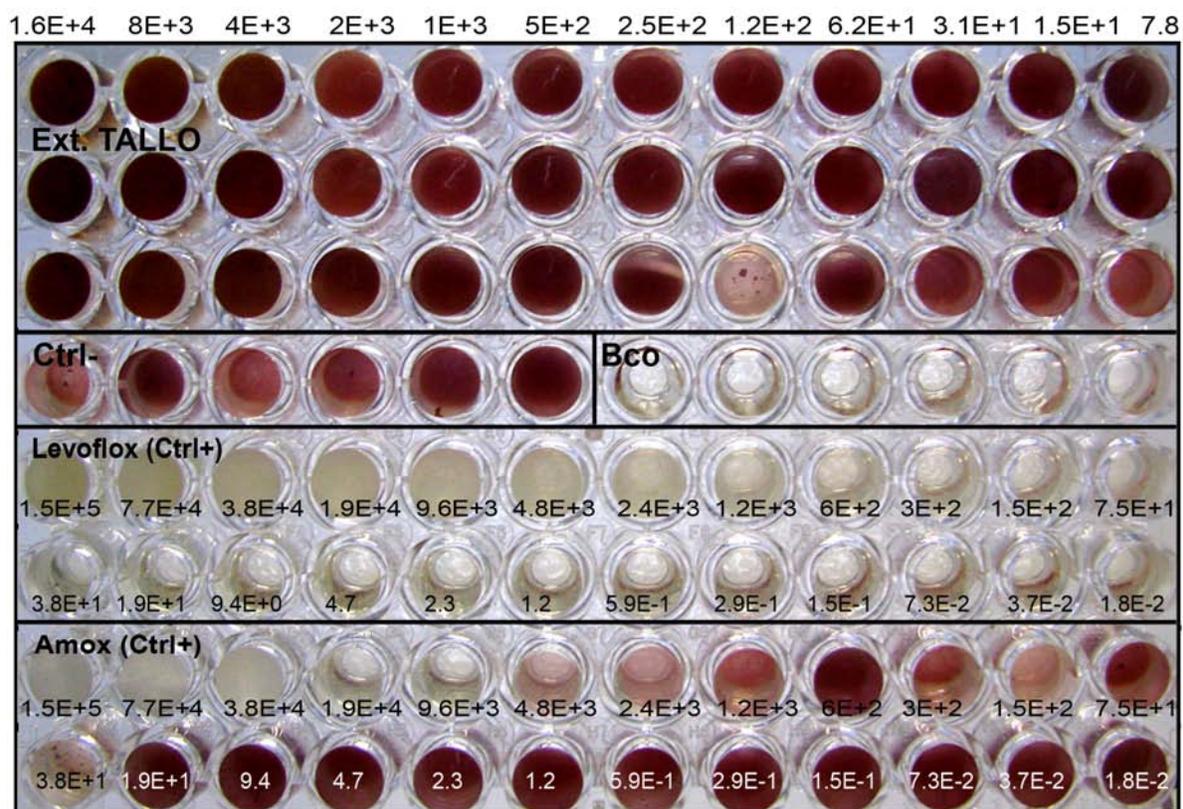


***Klebsiella pneumoniae* CFQ-B-89.** Extracto acuoso de hojas: Presentó actividad antibacteriana con una MCI de $1.25E^2 \mu\text{g/mL}$. MCI levofloxacino: $7.5E^1 \mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $4.8E^3 \mu\text{g/mL}$.



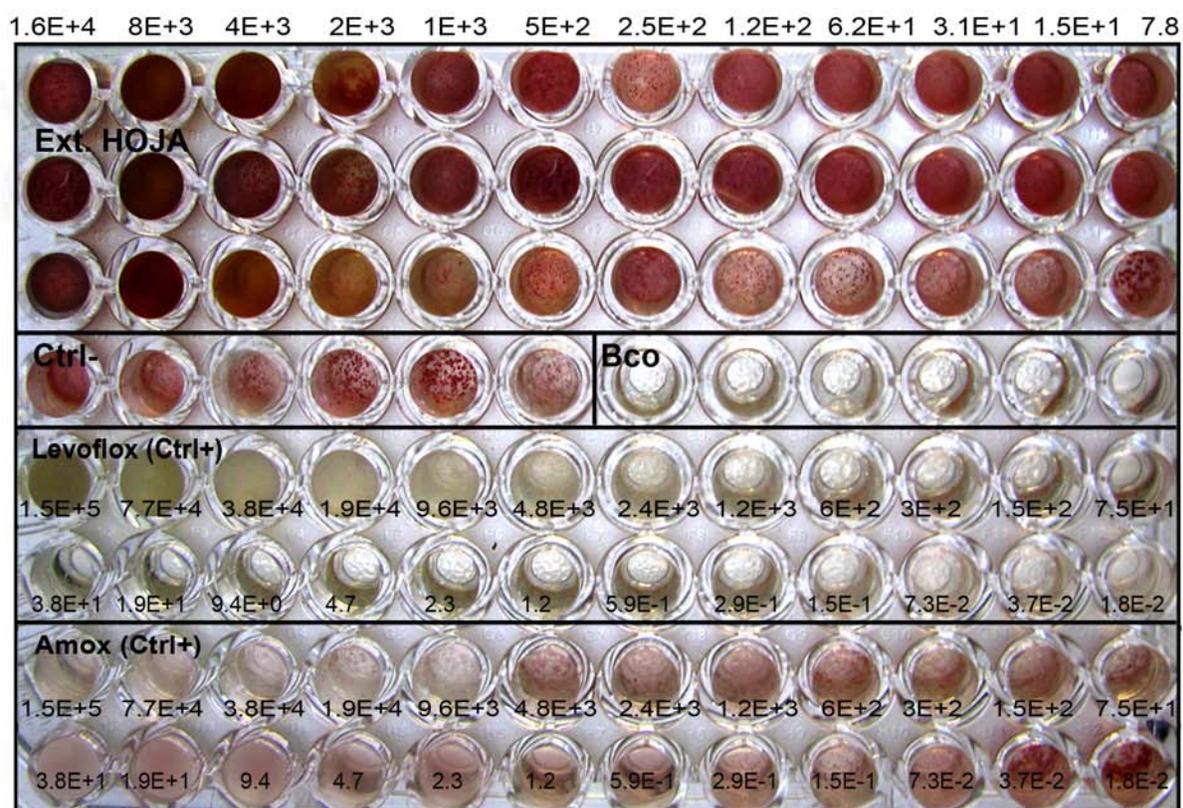
***Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.** Extracto acuoso de tallos: No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: $1.8 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $9.6 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$.

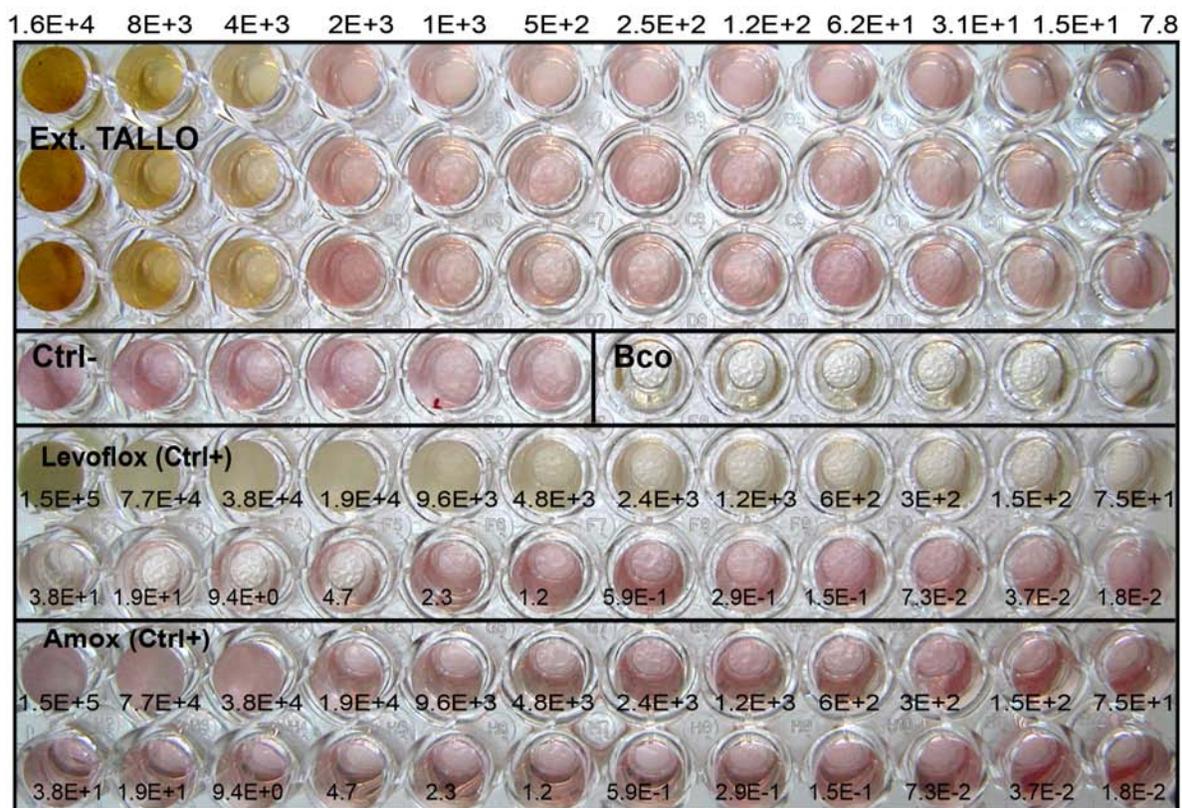


Pseudomona aeruginosa ATCC 27853. Extracto acuoso de hojas : No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: $1.8E^{-2} \mu\text{g}/\text{mL}$. MCI amoxicilina: $9.6E^3 \mu\text{g}/\text{mL}$.

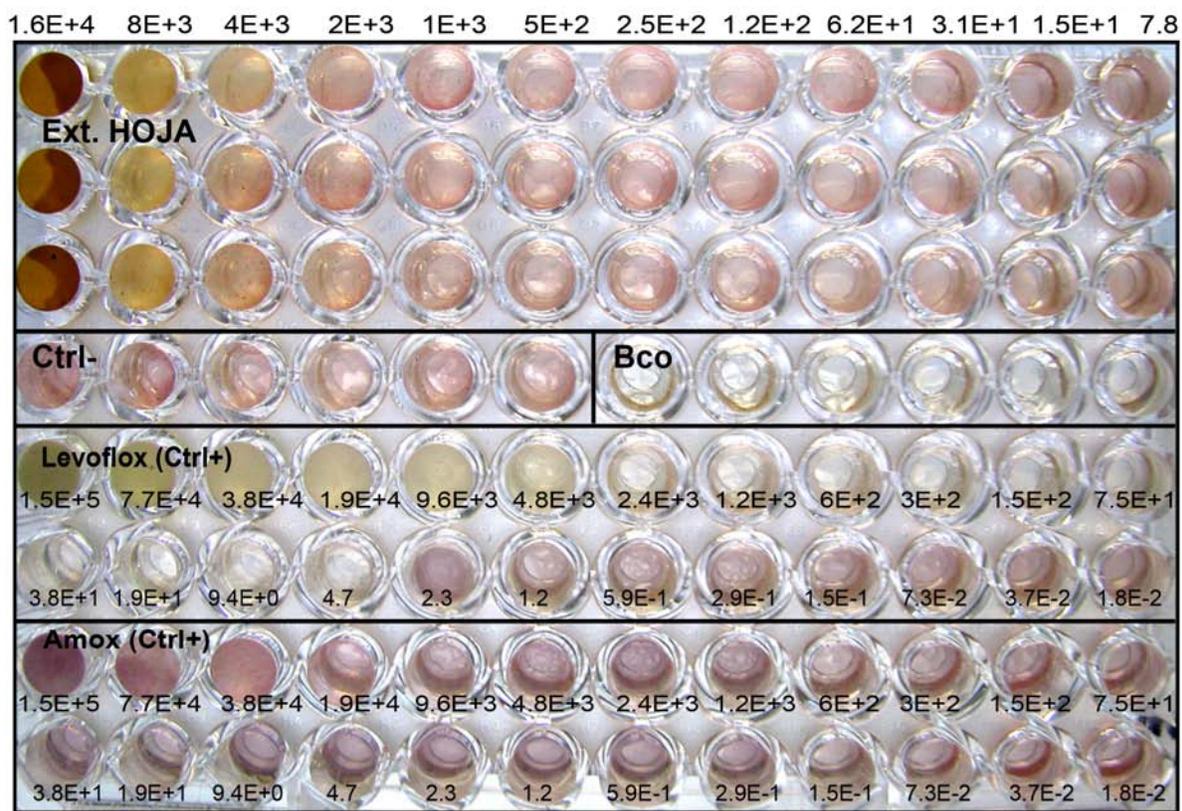


Staphylococcus aureus ATCC 6538. Extracto acuoso de tallos: Presentó actividad antibacteriana con una MCI de $4.7E^3$ $\mu\text{g/mL}$. MCI levofloxacino: $4.8E^3$ $\mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $>1.53E^5$ $\mu\text{g/mL}$.



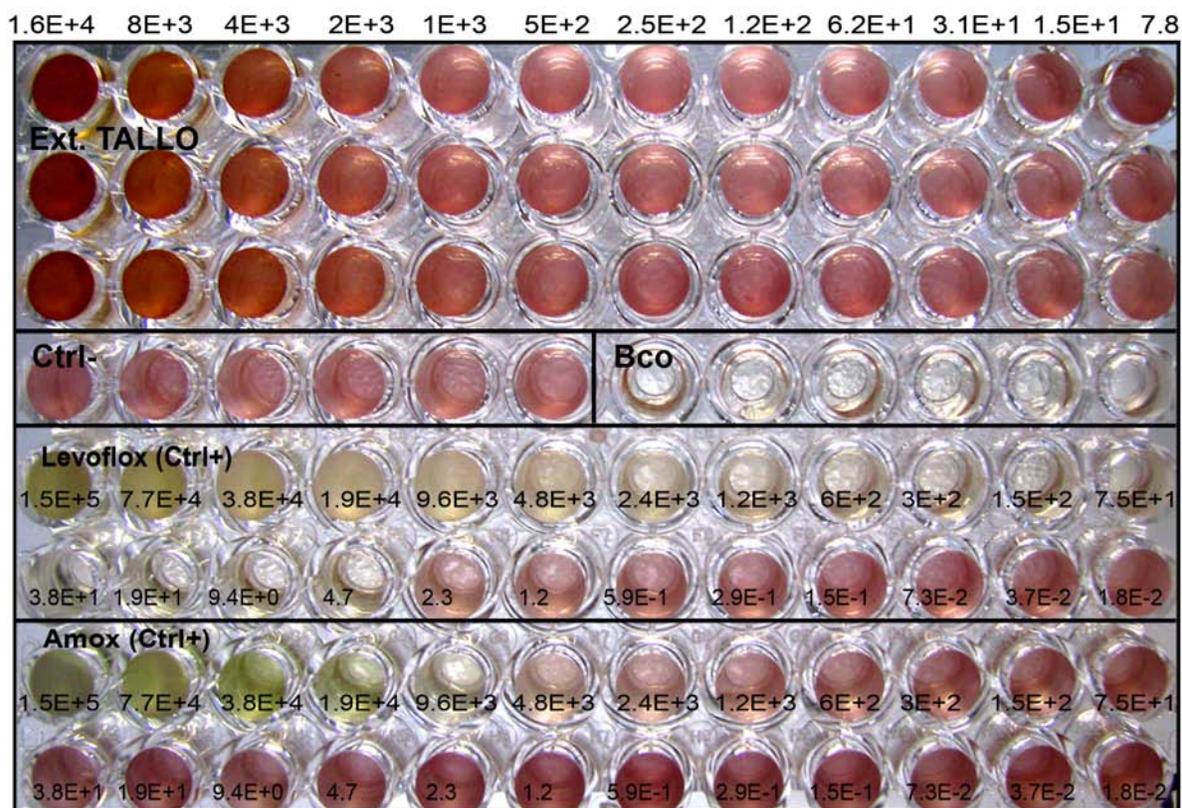
Staphylococcus aureus ATCC 6538. Extracto acuoso de hojas: No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: 4.8×10^3 $\mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $>1.53 \times 10^5$ $\mu\text{g/mL}$.



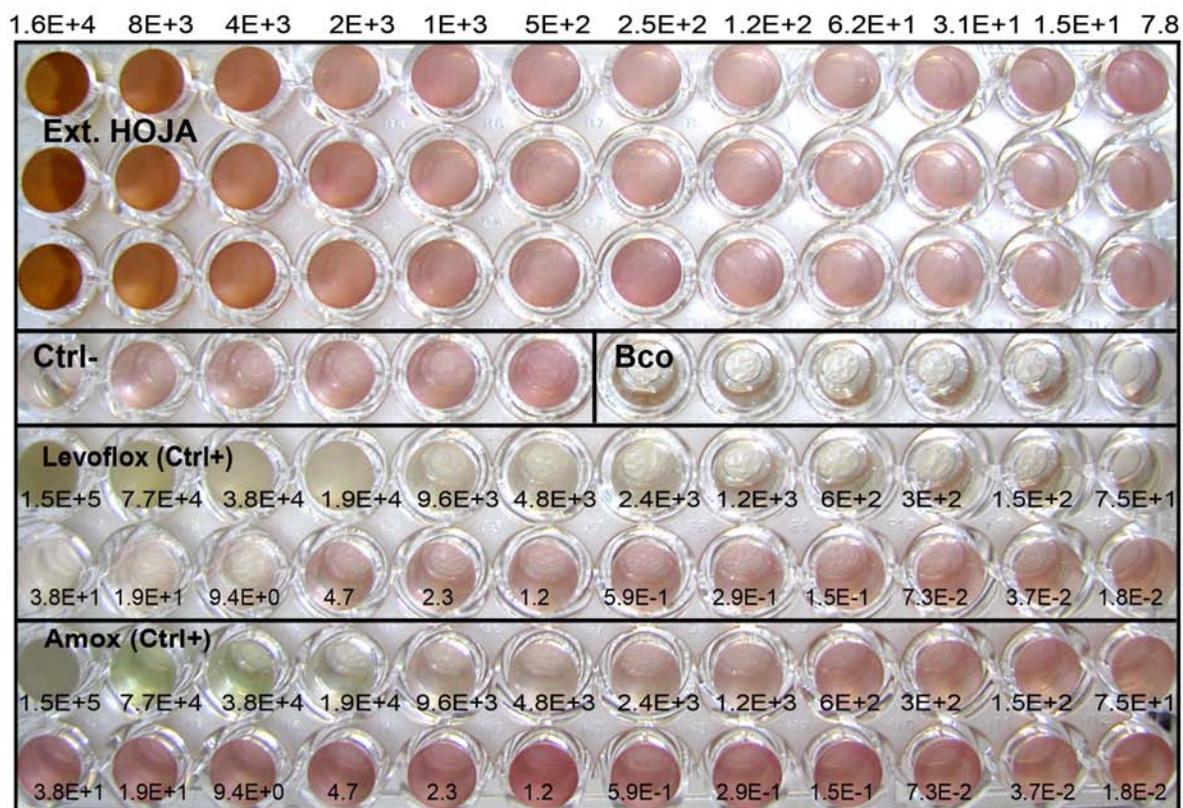
***Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.** Extracto acuoso de tallos: No presentó actividad antibacteriana.

MCI levofloxacino: 9.4 µg/mL. MCI amoxicilina: 9.6E³ µg/mL.



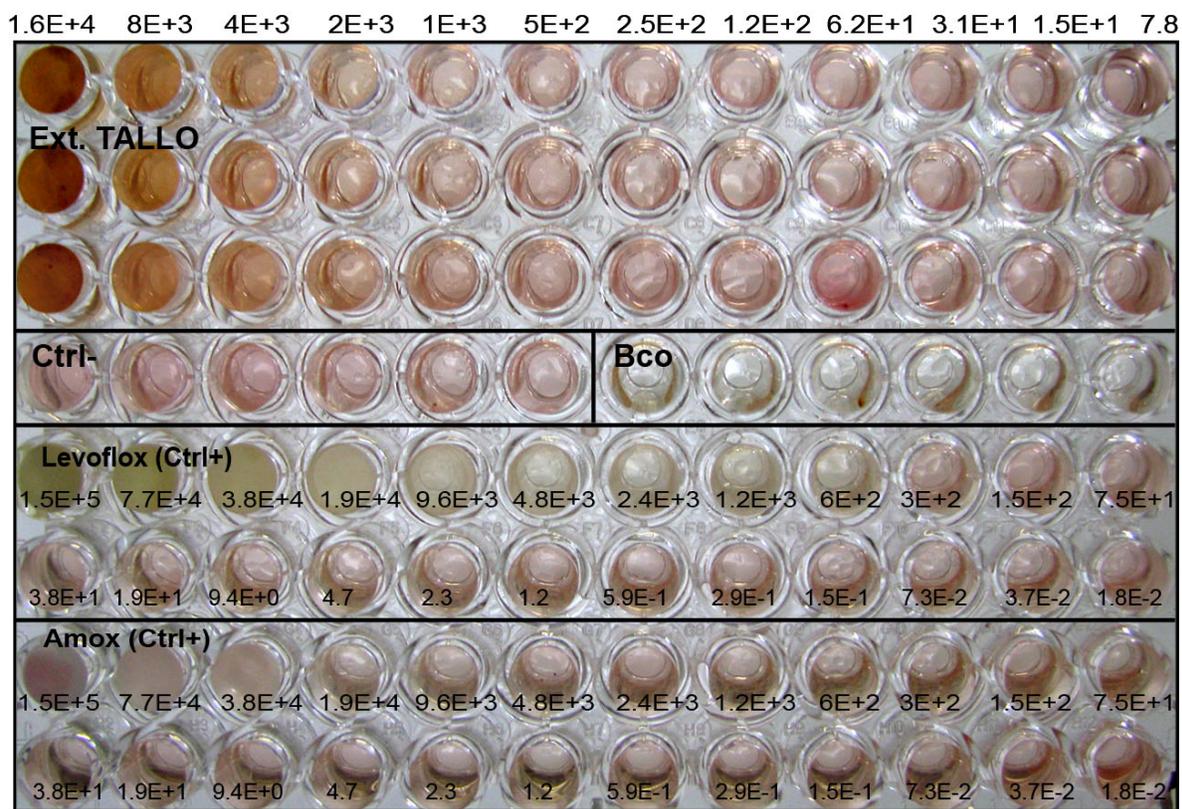
***Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.** Extracto acuoso de hojas: No presentó actividad antibacteriana.

MCI levofloxacin: 9.4 µg/mL. MCI amoxicilina: 9.6E³ µg/mL.



***Staphylococcus pyogenes* CFQ-B-220.** Extracto acuoso de tallos: No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: $6E^2 \mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $>1.5E^5 \mu\text{g/mL}$.



Staphylococcus pyogenes CFQ-B-220. Extracto acuoso de hojas: No presentó actividad antibacteriana. MCI

levofloxacino: $6E^2$ $\mu\text{g/mL}$. MCI amoxicilina: $>1.5E^5$ $\mu\text{g/mL}$.

