



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD
DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
Jefea pringlei (Greenm.) Strother**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ENRIQUE GONZÁLEZ MARTÍNEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. JULIETA OROZCO MARTÍNEZ
LOS REYES IZTACALA, EDO.
DE MÉXICO 2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Proyecto realizado en el laboratorio de farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA204915, UNAM DGAPA.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por abrirme sus puertas y regalarme unos de los mejores años de mi vida para crecer profesionalmente.

A mi tutora **Julieta Orozco Martínez**, por ser mi guía, compartir su tiempo, paciencia y sabiduría, sobre todo la invaluable amistad y cariño que me ha obsequiado, algo de lo que siempre estaré eternamente agradecido.

A mis sinodales:

- **Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado,**
- **Dra. Rocío Serrano Parrales,**
- **Dra. Adriana Montserrat Espinosa González**
- **Mtra. Marisol Ávila Romero**

Por el tiempo para dar seguimiento a este trabajo, el empeño y dedicación que pusieron en la ampliación de mi conocimiento, sus sabios consejos y por último pero no menos importante, la hermosa amistad que cada una de ustedes me brindaron durante toda esta odisea.

Dedicatoria

A mi padre Moisés González Allende, a mi madre Dorenza Martínez Lara, les agradezco el amor que me han demostrado día a día pese al cansancio, desvelo, lágrimas y reflexiones con tal de hacer de mí una persona de bien.

Gracias por traerme a la vida, gratifico cada mañana la dicha de verlos una vez más y poder salir con orgullo y ganas de triunfar pese a las dificultades, siempre teniendo en mente sus consejos y cariño, todo esto para hacer bien las cosas y dar de mí siempre lo mejor.

Me honra obtener este logro que es para ustedes.

Gracias por todo, los amo.

Agradecimientos

A mi familia

A mis padres por apoyarme con cosas materiales y sentimentales que necesitaba, a mi hermano Ismael y mis hermanas Gabriela y Marisol, por la comprensión y tolerancia que me tuvieron en este proceso y el apoyo que me brindaron cuando llegaba al cansancio, ¡¡¡Jamás los defraudare!!!

A mi prima Blanca Estela (QFB), por compartir su conocimiento científico, por esas largas charlas sobre nuestra pasión por la ciencia, al apoyarme con material de laboratorio y todas esas horas de distracción enfocadas a nuestro gusto por la música, de verdad eres la mejor prima hermana.

A mis amigos de fitoquímica y farmacognosia:

Juli, Chio, Monts, Erick, Omar, Estrella, Gelos, Say, Anita, por todos esos momentos de sabiduría infinita y hacerme ver que siempre hay cosas nuevas que aprender en el campo científico y como olvidar esas tardes de ir a comer alitas a reventar jajaja, es un gusto saber que se cuenta con su apoyo.

A mis amigos de la carrera

A Ismael por nuestros proyectos para poder hacer la vida más sustentable y ayudarme en el laboratorio a destilar jajaja, a Oscar por el apoyo en esta etapa tan loca de la carrera y por demostrarme que la amistad surge en el momento que menos esperas ¡¡gracias bro!! a Yazz e Itzel por enseñarme que, aunque las vidas toman cursos diferentes la amistad perdura, a todos mis amigos del grupo 02 gracias por su apoyo en mi vida personal y profesional, son fabulosos.

*“Gohan, protege a los seres vivos y a las plantas
de este mundo que tanto amé, te lo encargo”*

Número 16 (DBZ)

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción.....	2
Hipótesis.....	7
Objetivos	7
Objetivo general.....	7
Objetivos particulares.....	7
Materiales y métodos	8
1. Colecta del material.....	8
2. Obtención de los extractos	8
3. Evaluación de la actividad antibacteriana.....	8
3.1 Evaluación cualitativa	9
3.2 Evaluación cuantitativa	10
3.3 Efecto de los extractos de sobre la curva decrecimiento bacteriano	10
4. Evaluación de la actividad antifúngica.....	10
4.1 Evaluación cualitativa en hongos levaduriformes	11
4.2 Evaluación cuantitativa en hongos levaduriformes	11
4.3 Evaluación cualitativa en hongos filamentosos.....	12
4.4 Evaluación cuantitativa en hongos filamentosos	12
5. Cromatografías y pruebas de identificación de los grupos de metabolitos secundarios.....	12
6. Análisis estadísticos	13
Resultados y análisis.....	14
Discusión.....	31
Conclusiones.....	40
Anexos	42
Literatura citada.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Actividad antibacteriana del extracto acetílico de <i>J. pringlei</i> sobre cepas bacterianas.....	16
Figura 2. Efecto del extracto acetílico de <i>J. pringlei</i> sobre la curva de crecimiento de <i>M. luteus</i> : 1/2 CMI= 0.25 mg/mL; CMI= 0.5 mg/mL; CBM= 0.75 mg/mL.	18
Figura 3. Actividad antifúngica de los extractos de <i>J. pringlei</i> sobre cepas levaduriformes.....	19
Figura 4. Efecto del extracto de hexano de <i>J. pringlei</i> sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> : 1/2 CMI= 0.375 mg/mL; CMI= 0.75 mg/mL; CFM= 1.0 mg/mL.	21
Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>J. pringlei</i> sobre <i>T. metagrophytes</i>	23
Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>J. pringlei</i> sobre <i>A. niger</i>	24
Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>J. pringlei</i> sobre <i>F. moniliforme</i>	24
Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>J. pringlei</i> sobre <i>F. sporitrichum</i>	25
Figura 9. Cromatograma obtenido por HPLC del extracto acetílico de <i>J. pringlei</i> .	29
Figura 10. Cromatograma obtenido por HPLC del extracto metanólico de <i>J. pringlei</i>	29
Figura 11. Cromatograma del extracto hexánico de <i>J. pringlei</i>	30
Figura 12. <i>Jefea pringlei</i>	43
Figura 13: Localización geográfica de <i>Jefea pringlei</i> :.....	44

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Mecanismos de acción antimicrobiana.....	3
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas.....	9
Tabla 3. Cepas de hongos utilizadas	11
Tabla 4. Ficha técnica de <i>J. pringlei</i>	14
Tabla 5. Rendimiento de los extractos de <i>J. pringlei</i>	15
Tabla 6. Evaluación cuantitativa del extracto acetílico de <i>J. pringlei</i>	17
Tabla 7. CMI y CFM del extracto hexánico de <i>J. pringlei</i> sobre hongos levaduriformes.....	20
Tabla 8. CMI y CFM del extracto acetílico de <i>J. pringlei</i> sobre hongos levaduriformes.....	20
Tabla 9. Actividad antifúngica de los diferentes extractos de <i>J. pringlei</i> sobre hongos filamentosos.	22
Tabla 10. CF ₅₀ de los extractos de <i>J. pringlei</i> sobre hongos filamentosos.....	23
Tabla 11. Grupos de metabolitos secundarios en los extractos de <i>J. pringlei</i>	26
Tabla 12. HPLC del extracto acetílico de <i>J. pringlei</i>	27
Tabla 13. HPLC del extracto metanólico de <i>J. pringlei</i>	28
Tabla 14. GC-MS del extracto hexánico de <i>J. pringlei</i>	30

RESUMEN

Introducción: Los microorganismos han sido causa de diversas enfermedades afectando diferentes sectores de la población, aunque el uso de antimicrobianos ha aumentado la esperanza de vida, la medicina tradicional siempre ha sido un recurso alternativo para tratar diversos padecimientos. En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán se utiliza *Jefea pringlei* (Árnica) por los pobladores para tratar enfermedades gastrointestinales y quemaduras. Sin embargo, existe información limitada sobre esta especie en cuanto a estudios sobre su actividad biológica y composición química.

Materiales y métodos: Se obtuvieron los extractos hexánico, acético y metanólico mediante el método de maceración y destilación a presión reducida. La prueba antimicrobiana se realizó cualitativamente con el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en 20 bacterias y tres levaduras, para la actividad antifúngica se utilizó el método de inhibición de crecimiento radial en cuatro hongos miceliados, las pruebas cuantitativas se realizaron por dilución en agar para determinar la CMI/CBM (bacterias y levaduras) y CMI/CFM (hongos miceliados). Se realizaron pruebas colorimétricas y cromatografías para determinar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos.

Resultados: El extracto acético de *J. pringlei* mostró actividad antibacteriana en ocho cepas Gram positivas mostrando un efecto bacteriostático sobre la cepa *M. luteus* con una CMI de 0.5 mg/mL y una CBM de 0.75 mg/mL. El extracto hexánico presentó efectos significativos en tres tipos de hongos levaduriformes de *Candida*, mostrando una acción fungicida sobre *C. albicans* con una CMI de 0.75 mg/mL y una CFM de 1 mg/mL. Finalmente, los hongos miceliados fueron sensibles a los 3 extractos utilizados. En relación a las pruebas colorimétricas, se muestran 6 grupos de metabolitos secundarios, mientras que las cromatografías muestran una variedad de compuestos como cariofileno, nonadecano, eicosano, heneicosano, fenilpropanoides, fenoles y flavonoides.

Conclusiones: El presente trabajo aporta los primeros datos en cuanto a la actividad biológica y fitoquímica de *J. pringlei*, lo cual avala científicamente el uso de esta planta en la medicina tradicional para los pobladores del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han sido una de las causas más importantes de muerte en la humanidad a lo largo de su historia, sin embargo, la introducción de los antibióticos en el arsenal terapéutico (entre los años de 1940-1950) para el tratamiento y profilaxis de infecciones en humanos y animales supuso una de las intervenciones más importantes para su control y aumentó en varios años la esperanza de vida de la población (Lozano et al., 2012; Lord- Soulsby, 2011).

Los antimicrobianos son sustancias orgánicas naturales o sintéticas que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos. Además de su función defensiva, son utilizados para desinfección y antisepsia, así como controlar el crecimiento y proliferación de diferentes microorganismos (bacterias, hongos) (Russell, 2003). Entre sus usos también se incluyen en superficies, productos de higiene personal (lavado y desinfección de piel, boca, y otras superficies que tengan contacto con la piel o zonas irritantes del cuerpo) y conservación de alimentos (Carson et al., 2008).

Estos biocidas ejercen su potencial por varios tipos de mecanismos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones del microorganismo atacado, tal y como se observan en la tabla 1, los sitios de ataque pueden variar dependiendo de la estructura que presente el microorganismo al cual se busca combatir y el medicamento que se utilice (Calvo y Martínez, 2009; Allevato et al., 2007).

Tabla 1. Mecanismos de acción antimicrobiana

Mecanismo de acción	Antimicrobiano/s	Descripción
Inhibición de la síntesis de la pared celular	β -lactámicos	Dañan y afectan a la estructura protectoras de las bacterias.
Alteración sobre la membrana citoplasmática	Polimixinas Lipopéptidos	Estructura vital de las células, se modifica su permeabilidad volviéndola vulnerable.
Inhibición de síntesis proteica	Aminoglucósidos Ácido fusídico	Altera los procesos de activación, iniciación y fijación de complejos relacionados con la síntesis de proteínas.
Bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas Rifamicinas	Interfiere con la síntesis de bases para la obtención de ácidos nucleicos.

Actualmente existe otra alternativa para el tratamiento de enfermedades, como lo es la medicina tradicional, esta es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, estas prácticas tienen como finalidad mantener la salud, prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (OMS, 2000). Diversas culturas en el mundo se han apoyado en la medicina tradicional desde tiempos antiguos, donde se han utilizado una gran variedad de plantas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, diversas investigaciones han

comprobado las capacidades y eficacias terapéuticas que las plantas han tenido a través del tiempo (Ríos y Recio, 2005).

En México se tiene una tradición ancestral por el uso de plantas medicinales como primeros auxilios, existen manuscritos en náhuatl y en latín del siglo XVI como el códice “De La Cruz Badiano”, el cual muestra la relación del hombre prehispánico y el uso habitual de plantas medicinales, de este mismo, también se ha obtenido información ilustrada de al menos 41 plantas que siguen siendo utilizadas hoy en día para tratar enfermedades ocasionadas por diversos patógenos (De la Cruz, 1552).

Hay evidencias que destacan la importancia y la relación de los recursos vegetales a la subsistencia de diversos grupos humanos, tan solo en La Reserva del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, considerada como una de las zonas más ricas de México en cuanto a recursos vegetales (Casas et al., 2001), se han reportado un total de 808 especies de plantas útiles para sus pobladores, las cuales fueron identificadas y catalogadas por Casas y colaboradores en el 2001, en donde se destaca que alrededor de 243 especies son empleadas con fines medicinales. En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán existen diversos pueblos indígenas como Nahuas, Popolocas, Mazatecos, Chinantecos, Cuicatecos, Chocholtecos, Ixcatecos y Mixtecos (CONABIO, 2000), donde, para la mayoría de estos pobladores las plantas medicinales han representado una o la única opción de prevención y tratamiento de enfermedades (Tukari, 2011), demostrando así la importancia del uso medicinal de las plantas hoy en día.

Desde hace tiempo ha crecido el interés en la medicina alternativa para la cura de numerosos padecimientos y enfermedades que afectan a los seres humanos (Soto et al., 2002). Diversos países han usado diferentes plantas para tratar enfermedades como infecciones respiratorias, problemas gastrointestinales, urinarios, etcétera (Ríos y Recio, 2005).

Las plantas sintetizan compuestos conocidos como metabolitos secundarios (MS), los cuales le permiten emplear sistemas de defensa contra condiciones de

estrés abiótico y biótico. Aunque se encuentran almacenados en diferentes partes de la planta como la raíz, el tallo, las hojas, la flor e inclusive el polen, ciertas clases de MS se distribuyen en grupos taxonómicos exclusivos, algunos solo se encuentran a nivel de género o especie (Shilpa et al., 2010). Aparentemente no tienen una función en el metabolismo primario, pero si tienen una gran importancia ecológica ya que participan en diversos procesos de adaptación a su ambiente como la atracción de polinizadores y el establecimiento de simbiosis con otros organismos. Parte de esta síntesis produce metabolitos que también protegen al organismo de la herbívora, el ataque de microorganismos, la competencia por suelo, nutrientes y la exposición a la luz solar (Sepúlveda et al., 2003; Bourgaud et al., 2001).

Los MS son una fuente importante de principios activos para la producción de medicamentos y de valiosos productos químicos (Goossens et al., 2003). Aunque gran parte de los medicamentos se obtienen por síntesis química, la mayoría de las estructuras están basadas en productos naturales. Mundialmente existe un 44% de nuevos medicamentos basados en productos naturales y en países desarrollados el 25% de los medicamentos son derivados de plantas (Haq, 2004).

La familia Asteraceae ocupa un lugar predominante en la flora de México (Villaseñor, 2003). Más de 3,000 especies la ubican como la familia más diversa, representando alrededor de 13.5% de la riqueza florística total del país. Esta familia a su vez registra poco más de la mitad de sus especies como endémicas de México (Villaseñor, 2003; Turner y Nesom, 1993). Se ha reportado que diversas especies de esta familia tienen propiedades medicinales debido a la gran variedad de MS que llegan a poseer.

Abad y colaboradores en 2007, analizaron la actividad de los aceites esenciales de plantas aromáticas de dos familias: Lamiaceae y Asteraceae. Los aceites de la familia Asteraceae, mostraron actividad antifúngica contra hongos patógenos como *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*; en donde la actividad

antifúngica se le atribuyó a la piperitona y piperitenona, dos componentes principales de estas plantas. Compuestos como las sesquiterpenlactonas aisladas de especies de esta familia, también han demostrado tener actividad antifúngica contra nueve diferentes especies de hongos.

Especies del género *Tagetes* como *T. patula*, *T. pusila*, *T. minuta*, *T. lucida* y *T. máxima* (Asteraceae) han presentado efectos nematocida, insecticida, antifúngico, antibacteriano, antiinflamatorio y antioxidante. Estas actividades biológicas han sido relacionadas con la presencia de piretrina, flavonoides y terpenoides (Parejo, 2005; De las Heras, 1998; Singh, 1987).

Se ha reportado que el extracto clorofórmico, metanólico y acuoso de la planta entera, la raíz y de las hojas de *Bidens pilosa* (Asteraceae) demostraron actividad frente a *C. albicans*. Al igual, se reporta la actividad de la droga “cerbiden” de *B. cernua* la cual es significativa contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* (Hladun, 2002).

Rodríguez y colaboradores en el 2017 realizaron un estudio con *Heteroteca inuloides* (Asteraceae) determinando los componentes químicos y sus propiedades biológicas, demostrando así las capacidades antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatoria, antioxidante e insecticida.

Dentro de la familia Asteraceae se encuentra *Jefea pringlei* (Anexos 1 y 2), Castelo y colaboradores en el 2005 realizaron un catálogo de especies de la misma familia donde se confirma el endemismo de *J. pringlei* en las zonas de Oaxaca y Puebla. Dentro del Valle de Tehuacán-Cuiacatlán se conoce a esta especie como árnica la cual es utilizada para tratar problemas gastrointestinales y quemaduras principalmente, sin embargo, existe información limitada sobre esta especie sobre su actividad biológica y composición química.

HIPÓTESIS

Dentro de la gama de especies de la familia Asteraceae existe una variedad de plantas que han sido reportadas con diferentes efectos medicinales, esto, debido a que poseen metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, *Jefea pringlei* es una especie utilizada por los pobladores del Valle de Tehuacán-Cuicatlán para tratar enfermedades gastrointestinales y quemaduras principalmente, por lo cual se infiere que los extractos de esta planta pueden ser activos en diferentes microorganismos patógenos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana de *J. pringlei*.

Objetivos particulares

- Obtener los extractos hexánico, acetílico y metanólico de *J. pringlei*.
- Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *J. pringlei*.
- Evaluar el efecto de los extractos activos mediante la curva de crecimiento de poblaciones microbianas.
- Determinar cualitativamente la composición química general de los extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colecta del material

La planta *J. pringlei* se colectó el ocho de febrero del 2015 en la localidad de Acatepec, Puebla, en la carretera rumbo a Caltepec en las coordenadas 18°12'22.22'' N y 97°34'16.8'' W, a 1574 msnm y se depositó un ejemplar en el Herbario IZTA para su identificación, con un número de colecta IZTA 2522.

2. Obtención de los extractos

Los extractos de *J. pringlei* se obtuvieron por el método de maceración (Dominguez, 1979), para esto se utilizó la parte aérea, se pesó la planta seca y se cortó en trozos los cuales fueron colocados en un matraz Erlenmeyer con solventes de polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo y metanol). En cada extracto se hizo un filtrado y se destiló a presión reducida en un rotavapor. El extracto resultante se colocó en un recipiente de vidrio para permitir la evaporación del solvente faltante y para finalizar se calculó el rendimiento del extracto.

3. Evaluación de la actividad antibacteriana

Para los bioensayos se utilizaron 20 cepas de importancia médica obtenidas del laboratorio de farmacognosia en la UBIPRO, FES Iztacala (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas

	Bacterias	Clasificación, serotipo o donadas por
Gram positivas	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 14506
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240
	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
	<i>S. aureus</i>	23 MR
	<i>S. aureus</i>	FES-C
	<i>S. aureus</i>	CUSI
	<i>S. aureus</i>	CC
	<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>S. epidermidis</i>	FES-C
Gram negativas	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
	<i>E. gergoviae</i>	ATCC 33028
	<i>Escherichia coli</i>	82 MR
	<i>E. coli</i>	CUSI
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 8724
	<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi</i>	ATCC 7251
	<i>S. typhi</i>	
	<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756
	<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 39540

- **CC:** Caso clínico, **CUSI:** Clínica Universitaria de Salud Integral Iztacala, **FES-C:** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, **FES-I:** Facultad de Estudios Superiores Iztacala, **MR:** Multiresistente.

3.1 Evaluación cualitativa

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se llevó a cabo con el método de difusión en agar Kirby-Bauer. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol, como tratamiento sensidiscos con 2 mg del extracto y como control negativo se emplearon sensidiscos con 10 µL del

solvente empleado en la extracción (Cole, 1994; Vander Berghe y Vlietinck, 1991). La prueba se realizó por triplicado (Anexo 3).

3.2 Evaluación cuantitativa

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se utilizó la microtécnica de dilución en caldo, en donde las concentraciones empleadas fueron de: 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/mL de los extractos. Las cajas fueron inoculadas con 50 µL de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL incubado durante 24 h. (Koneman, 1985). La prueba se realizó por triplicado (Anexo 4).

3.3 Efecto de los extractos de sobre la curva decrecimiento bacteriano

Se evaluó el efecto de los extractos activos sobre una curva de crecimiento bacteriano. Se utilizaron las cepas que presentaron mayor sensibilidad en las pruebas cualitativas. Se registró el crecimiento de las cepas durante nueve tiempos en 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Kubo et al., 1993) (Anexo 5).

4. Evaluación de la actividad antifúngica

Se utilizaron cepas de hongos levaduriformes y filamentosos de importancia médica y agronómica obtenidas del laboratorio de farmacognosia en la UBIPRO, FES Iztacala (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de hongos utilizadas

Hongos miceliados	Levaduras
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Candida albicans</i> 17 MR
<i>Fusarium sporotrichum</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Aspergillus niger</i>	

- **MR:** Multiresistente

4.1 Evaluación cualitativa en hongos levaduriformes

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos sobre levaduras, se llevó a cabo con el método de difusión en agar Kirby-Bauer. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 30 µg de nistatina, como tratamiento sensidiscos con 2 mg del extracto y como control negativo se emplearon sensidiscos con 10 µL del solvente empleado en la extracción (Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991). La prueba se realizó por triplicado (Anexo 3).

4.2 Evaluación cuantitativa en hongos levaduriformes

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se utilizó la microtécnica de dilución en caldo, en donde las concentraciones empleadas fueron: 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/mL. Las cajas fueron inoculadas con 50 µL de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL incubado durante 24 h. (Koneman, 1991). La prueba se realizó por triplicado (Anexo 4).

4.3 Evaluación cualitativa en hongos filamentosos

La evaluación cualitativa para hongos filamentosos se realizó con el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 50 µg de ketoconazol, como tratamiento sensidiscos con 2 mg del extracto y como control negativo se emplearon sensidiscos con 10 µL del solvente empleado en la extracción. La prueba se realizó por triplicado (Anexo 6).

4.4 Evaluación cuantitativa en hongos filamentosos

La determinación de la Concentración Fungicida Media (CFM) se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial, en donde el extracto se incluyó en el agar, las concentraciones que se utilizaron fueron: 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/mL (Método modificado de Wang y Bun, 2002) La prueba se realizó por triplicado (Anexo 7).

5. Cromatografías y pruebas de identificación de los grupos de metabolitos secundarios

Los extractos se analizaron mediante las pruebas cualitativas descritas por Domínguez en 1979, de presencia y/o ausencia de alcaloides (Mayer y Dragendorf), fenoles (Cloruro férrico), flavonoides (Prueba de Shinoda), taninos (FeCl₃), monoterpenos (vainillina y ácido sulfúrico), cumarinas (NaOH), saponinas (agitación), esteroides y triterpenos (Reactivo de Lieberman-Buchard) (Anexo 8).

Para los extractos de mediana y alta polaridad (metanol y acetato de etilo) se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) con una columna Discovery C-18 con un tamaño 250-4.6 mm y una partícula de 5.0 µm y se corrió de forma isocrática con una fase móvil de metanol, acetonitrilo y agua en una

proporción de 25:25:50 con un flujo de 1 mL/min. y con un detector de arreglo de diodos (DAD) a una λ de 260 nm, realizando un barrido completo de 200 a 400 nm. Se inyectó una muestra de 30 μ L de cada extracto (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002) (Anexo 9).

Adicionalmente se realizaron pruebas cromatográficas para cada tipo de extracto. Para el extracto de baja polaridad (hexano) se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) con un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 con una columna capilar HP-5MS (30m x 0.250mm; espesor de la película 0.25 mm). El gas utilizado fue helio a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto. El volumen inyectado del extracto fue de 1 μ L. El gradiente de temperatura abarco un rango inicial de 70°C a un máximo de 230°C. El gas empleado fue helio (He) (Anexo 9).

6. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA factorial) para determinar si existe alguna diferencia significativa entre la actividad antibacteriana de los tres extractos y el control. En relación con la CF_{50} de los hongos filamentosos, se realizó un análisis de regresión logarítmica con los datos obtenidos y así mostrar la relación de la concentración del extracto con la inhibición del crecimiento.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

1. Datos etnobotánicos de *J. pringlei*

La determinación del material vegetal colectado en el municipio de Acatepec en el estado de Puebla fue realizada por Héctor H. Cervantes Maya en el herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, los datos de colecta se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Ficha técnica de *J. pringlei*.

Nombre científico	<i>Jefea pringlei</i> (Greenm.) Strother
Nombre local	Árnica
Uso	Se emplea contra dolores, golpes y heridas
Fecha de colecta	08 de febrero 2015
Colector	Héctor Cervantes Maya
Zona de colecta	Acatepec, Puebla
Número de registro	IZTA 2522
Distribución	Puebla y Oaxaca (México)

2. Obtención de los extractos

En la tabla 5 se muestran los rendimientos de los extractos de *J. pringlei*, se observa que del extracto metanólico obtuvo el mayor rendimiento (12.16%), seguido por el extracto acetílico (4.29%) y finalmente el extracto hexánico (1.62%).

Tabla 5. Rendimiento de los extractos de *J. pringlei*.

Extracto	Rendimiento en gramos	%
Hexánico	3.97	1.62
Acetónico	10.49	4.29
Metanólico	29.68	12.16

- Los rendimientos de los extractos se obtuvieron a partir de 244 g. de planta seca.

3. Evaluación de la actividad antibacteriana

3.1 Evaluación cualitativa

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana (figura 1) muestra que el extracto acetílico presentó actividad solamente en 8 bacterias Gram positivas de las 20 utilizadas: *E. faecalis*, *M. luteus*, *S. aureus* 23 MR, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* CC, *S. aureus* CUSI, *S. aureus* FES-C y *S. epidermidis*. Los extractos hexánico y metanólico no presentaron actividad antibacteriana.

Las 5 cepas de *S. aureus* presentaron halos de inhibición en todos los seriotipos o clasificaciones de la cepa, incluyendo el caso clínico y la multirresistente, los cuales son cepas más difíciles de eliminar debido a su origen y a la complejidad genética que representan.

De acuerdo con el análisis estadístico (ANOVA factorial) los halos de inhibición del control positivo (cloranfenicol) y del extracto acetílico muestran diferencias significativas respecto a los diámetros ($F=3.19$, $p\leq 0.05$).

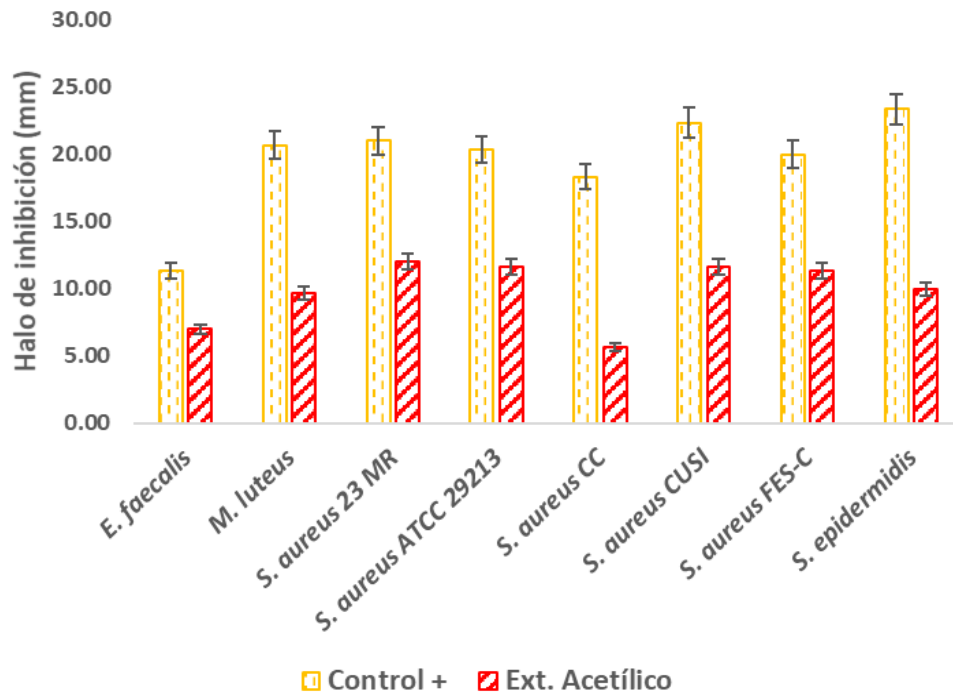


Figura 1. Actividad antibacteriana del extracto acetílico de *J. pringlei* sobre cepas bacterianas.

3.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Los resultados obtenidos en las pruebas cuantitativas se presentan en la tabla 6, se observa que *M. luteus* denota una mayor sensibilidad que las demás cepas con una CMI de 0.5 mg/mL y una CBM de 0.75 mg/mL, seguido de *E. faecalis* con una CMI de 0.75 mg/mL y una CBM de 1.0 mg/mL.

En contraste las cepas más resistentes fueron *S. aureus* ATCC 29213 con una CMI de 2.0 mg/mL y una CBM mayor a los 2 mg/mL y *S. aureus* CUSI con una CMI y una CBM superior a los 2 mg/mL. Sin embargo, las cepas de *S. aureus*

MR, CC y FES-C mostraron concentraciones inferiores a los ya mencionados (CMI = 1.0 mg/mL y CBM = 1.5 mg/mL).

Tabla 6. Evaluación cuantitativa del extracto acetílico de *J. pringlei*.

Cepa	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>E. faecalis</i>	0.75	1.0
<i>M. luteus</i>	0.5	0.75
<i>S. aureus</i> 23 MR	1.0	1.5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2.0	> 2.0
<i>S. aureus</i> CC	1.0	1.5
<i>S. aureus</i> CUSI	> 2.0	> 2.0
<i>S. aureus</i> FES-C	1.0	1.5
<i>S. epidermidis</i>	1.0	1.5

3.3 Efecto del extracto acetílico sobre la curva de crecimiento de *M. luteus*.

En esta prueba se utilizó *M. luteus* ya que fue la cepa que mostró mayor sensibilidad en la prueba cuantitativa, los resultados obtenidos en la curva de crecimiento microbiano se presentan en la figura 2, el extracto acetílico mostro disminución del crecimiento bacteriano con las concentraciones evaluadas en comparación con el testigo. El mejor efecto se observó en la concentración de 0.75 mg/mL (CBM) donde se inhibió el 33.4% del crecimiento de la población bacteriana.

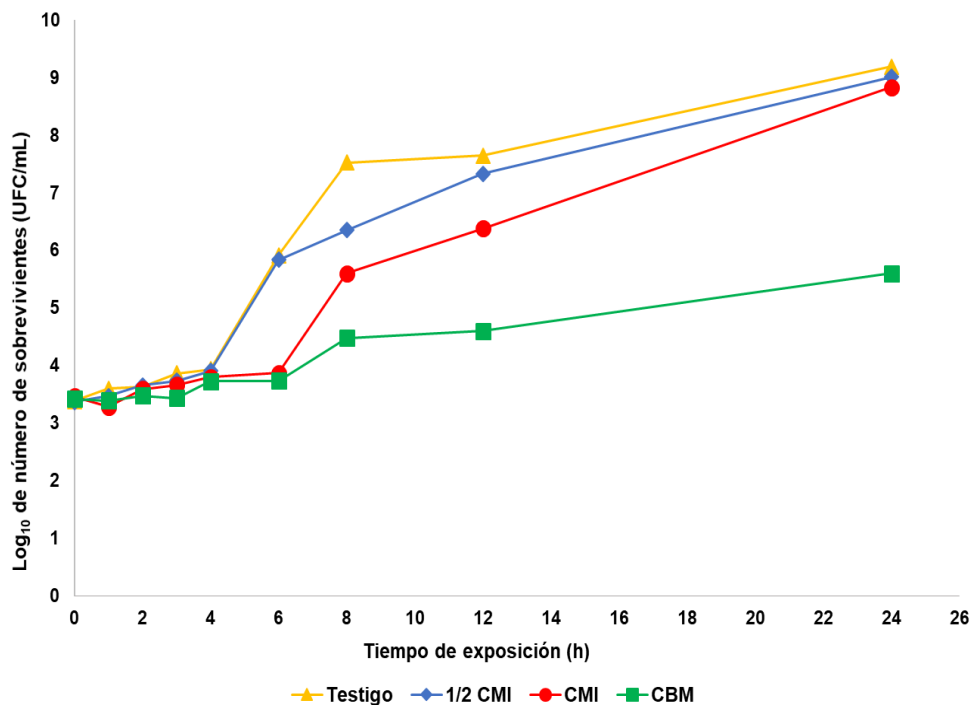


Figura 2. Efecto del extracto acetílico de *J. pringlei* sobre la curva de crecimiento de *M. luteus*: 1/2 CMI= 0.25 mg/mL; CMI= 0.5 mg/mL; CBM= 0.75 mg/mL.

4. Evaluación de la actividad antifúngica

4.1 Evaluación de la actividad antifúngica de en hongos levaduriformes

En la prueba cualitativa en levaduras (figura 3) el extracto hexánico presentó actividad en los tres tipos de cepas utilizadas; *C. albicans* 17 MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. En cuanto al extracto acetílico presentó actividad en; *C. albicans* 17 MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis*.

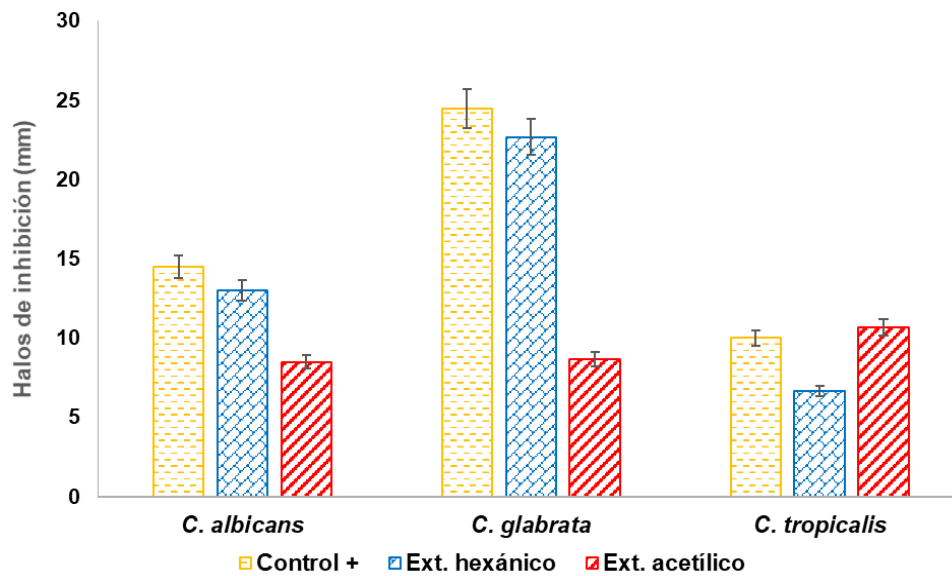


Figura 3. Actividad antifúngica de los extractos de *J. pringlei* sobre cepas levaduriformes.

4.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) del extracto hexánico y acetílico en hongos levaduriformes

En las pruebas cuantitativas de CMI y CFM las levaduras fueron más sensibles al extracto hexánico (tabla 7), se presentaron valores de CMI igual a 0.75 mg/mL y una CFM de 1.0 mg/mL en las tres cepas, por otra parte, para el extracto acetílico se obtuvieron valores en la CMI de 4.0 mg/mL y una CFM mayor a 4 mg/mL en las tres especies de *Candida* (tabla 8).

Tabla 7. CMI y CFM del extracto hexánico de *J. pringlei* sobre hongos levaduriformes.

Cepa	CMI (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>C. albicans</i> 17 MR	0.75	1.0
<i>C. glabrata</i>	0.75	1.0
<i>C. tropicalis</i>	0.75	1.0

Tabla 8. CMI y CFM del extracto acetílico de *J. pringlei* sobre hongos levaduriformes.

Cepa	CMI (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>C. albicans</i> 17 MR	4.0	> 4.0
<i>C. glabrata</i>	4.0	> 4.0
<i>C. tropicalis</i>	4.0	> 4.0

Efecto del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17 MR

Con respecto al efecto del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17 MR (figura 4), las concentraciones utilizadas inhibieron el crecimiento de la cepa. La concentración de 0.375 mg/mL (1/2 CMI) mostró un efecto fungistático inhibiendo el 33.4% de la población microbiana, mientras que las otras concentraciones de 0.75 mg/mL (CMI) y 1 mg/mL (CFM) se observó un efecto fungicida a las tres horas de exposición del microorganismo con el extracto, dándose así la muerte del 99.9% de la población.

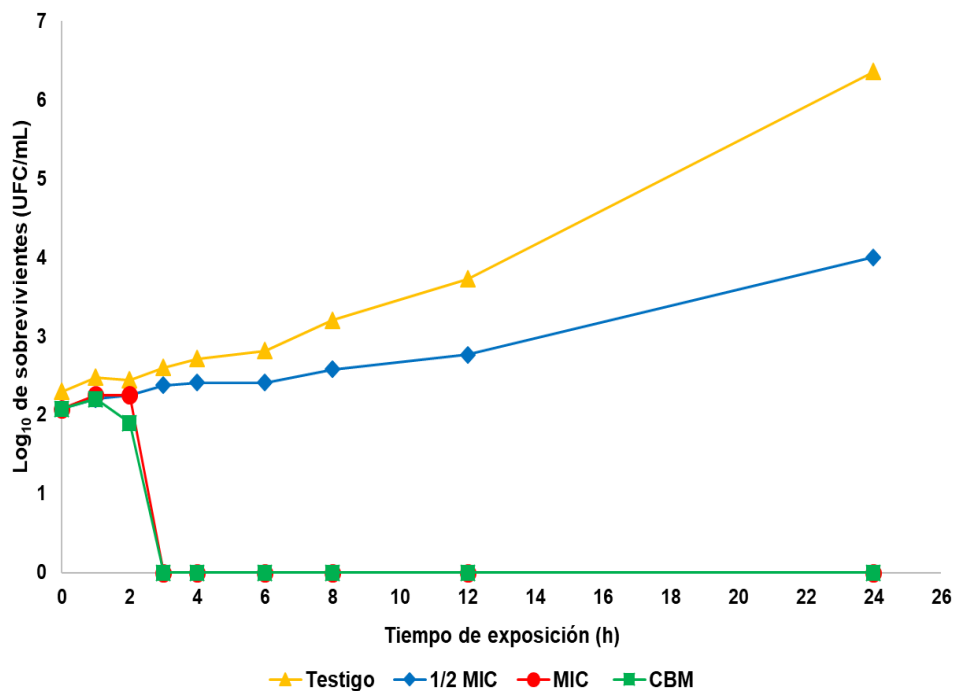


Figura 4. Efecto del extracto de hexano de *J. pringlei* sobre la curva de crecimiento de *C. albicans*: 1/2 CMI= 0.375 mg/mL; CMI= 0.75 mg/mL; CFM= 1.0 mg/mL.

4.3 Evaluación de la actividad antifúngica en hongos filamentosos

En la tabla 9 se presentan los resultados de las pruebas cualitativas de los extractos en hongos filamentosos. El extracto acetílico fue el único que presentó actividad sobre las cuatro cepas evaluadas: *T. mentagrophytes*, *A. niger*, *F. moniliforme* y *F. sporotrichum*, en tanto con los extractos hexánico y metanólico no lograron inhibir el crecimiento de *A. niger* y *F. sporotrichum* respectivamente.

Tabla 9. Actividad antifúngica de los diferentes extractos de *J. pringlei* sobre hongos filamentosos.

Hongo	Control +	Hexano	Acetato de etilo	Metanol
<i>T. mentagrophytes</i>	•	•	•	•
<i>A. niger</i>	•	•	•	
<i>F. moniliforme</i>	•	•	•	•
<i>F. sporotrichum</i>	•		•	•

• = Actividad

4.4 Concentración Fungicida Media (CF₅₀) sobre hongos filamentosos

En la tabla 10 se muestran las concentraciones necesarias de los tres extractos para inhibir el 50% del crecimiento de los hongos utilizados. Las cepas de *F. moniliforme* y *F. sporotrichum* necesitaron una concentración de 1.97 mg/mL de los extractos acetílico y metanólico respectivamente, el crecimiento de *T. mentagrophytes* es inhibido con 2.86 mg/mL del extracto metanólico y finalmente para *A. niger* se necesita de 3.65 mg/mL del extracto hexánico para inhibir el 50%

del crecimiento. Todo lo anterior resalta las concentraciones más bajas requeridas para detener la mitad del crecimiento, dichos comportamientos se pueden observar para *T. mentagrophytes* (figura 5), *A. niger* (figura 6), *F. moniliforme* (figura 7) y *F. sporotrichum* (figura 8).

Tabla 10. CF_{50} de los extractos de *J. pringlei* sobre hongos filamentosos.

Extracto	Hexánico (mg/mL)	Acetílico (mg/mL)	Metanólico (mg/mL)
<i>T. mentagrophytes</i>	5.1	5.7	2.86
<i>A. niger</i>	3.65	3.86	NA
<i>F. moniliforme</i>	5.66	1.97	8.74
<i>F. sporotrichum</i>	NA	2.5	1.97

• NA = No Activo

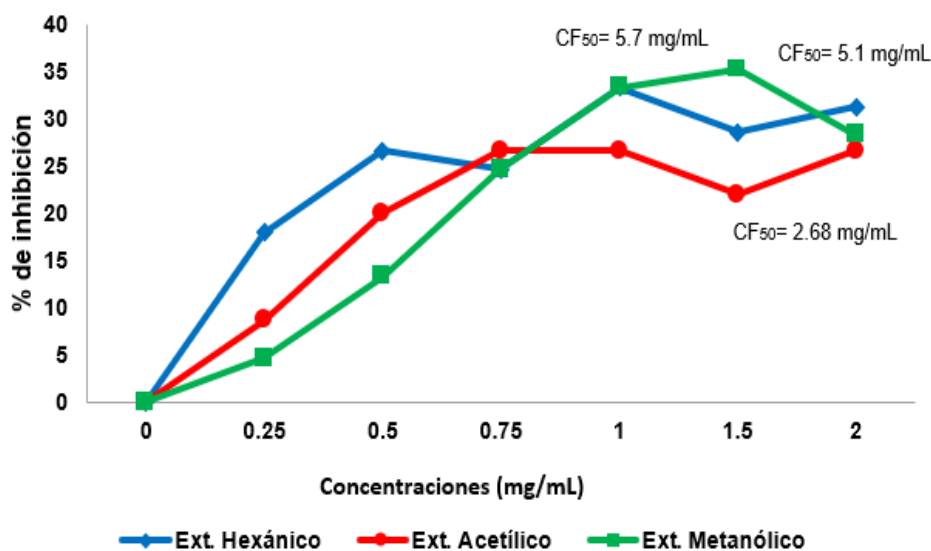


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de *J. pringlei* sobre *T. mentagrophytes*.

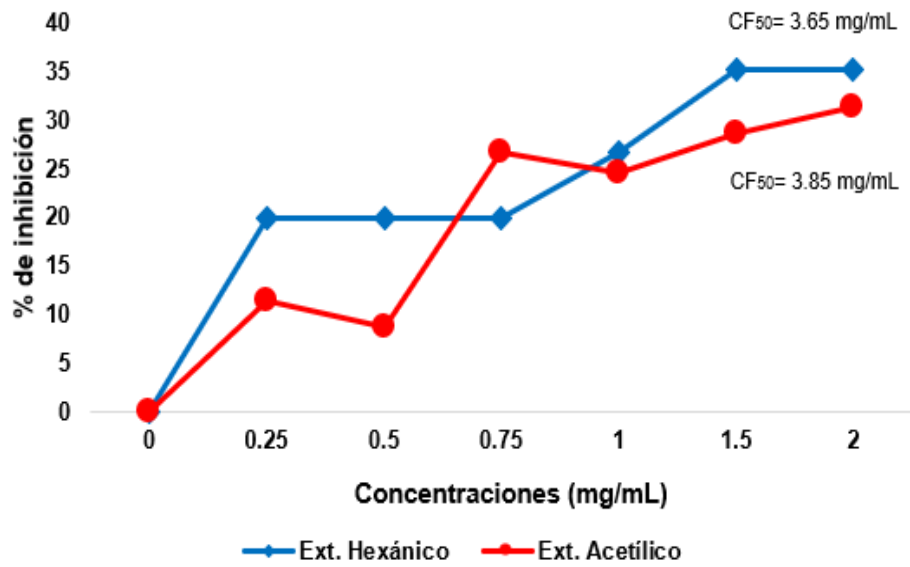


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de *J. pringlei* sobre *A. niger*.

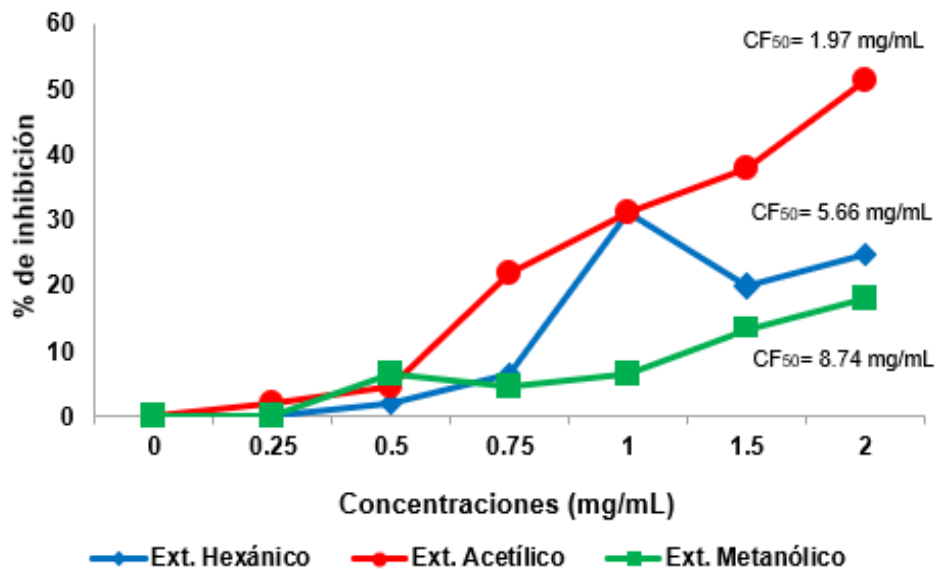


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de *J. pringlei* sobre *F. moniliforme*.

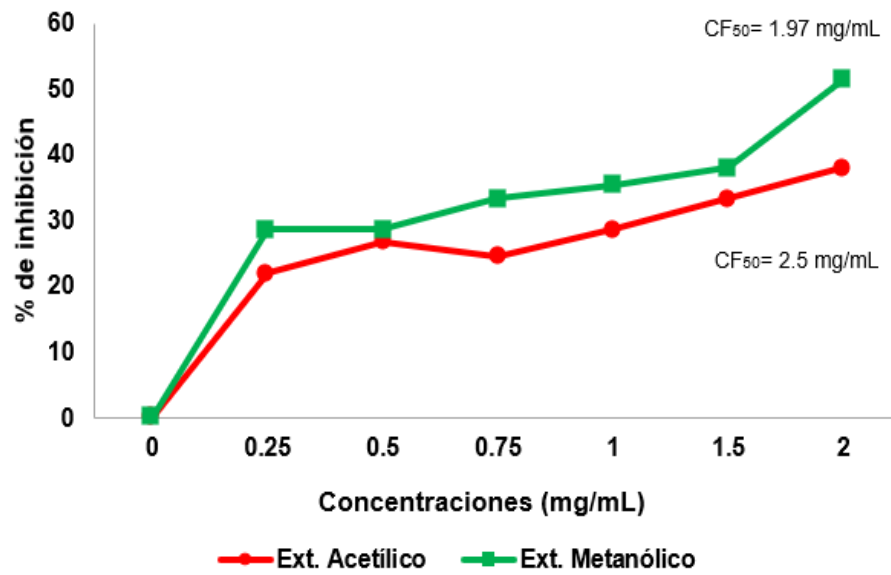


Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos de *J. pringlei* sobre *F. sporotrichum*.

5. Cromatografías y pruebas cualitativas de identificación de los grupos de metabolitos secundarios

Pruebas cualitativas

En la tabla 11 se muestran los principales grupos de metabolitos secundarios (MS) que constituyen a los extractos hexánico, acetílico y metanólico.

En el extracto hexánico se puede notar la presencia de monoterpenos y glicósidos, para los extractos acetílico y metanólico hay grupos de fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas y monoterpenos. En el caso de los esteroides y/o triterpenos solo se encuentran presentes en el extracto acetílico.

Tabla 11. Grupos de metabolitos secundarios en los extractos de *J. pringlei*.

	Hexano	Acetato de etilo	Metanol
Saponinas	---	---	---
Fenoles	---	+++	+++
Flavonoides	---	+++	+++
Taninos	---	+++	+++
Alcaloides	---	---	---
Cumarinas	---	+++	+++
Esteroides y/o Triterpenos	---	+++	---
Monoterpenos	+++	+++	+++
Glicósidos	+++	---	---

- (---) Prueba negativa, (+++) Prueba positiva

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Para el HPLC, las muestras inyectadas se leyeron a una absorbancia de 280 nm, se observa la presencia de 12 picos para el extracto acetílico en un lapso de 20 minutos (figura 9), en contraste con el extracto metanólico (figura 10), en el cual se puede apreciar la presencia de 9 picos en un lapso de 22 minutos encontrando compuestos como flavonoides y fenilpropanoides (tabla 12 y 13).

Tabla 12. HPLC del extracto acetílico de *J. pringlei*.

Pico	TR (min)	Absorbancias (nm)	Compuesto
1	2.75	220, 246, 326	Flavonoide
2	3.05	284, 324	Fenilpropanoide
3	3.22	272	Fenilpropanoide
4	3.42	218, 282, 342	Flavonoide
5	4.2	212	Fenilpropanoide
6	5.25	204	Fenilpropanoide
7	6.2	200, 344	Fenilpropanoide
8	6.95	200, 342	Fenilpropanoide
9	8.57	200, 272, 346	Flavonoide
10	10.48	200, 280, 332	Flavonoide
11	11.51	200, 268, 340	Flavonoide
12	12.78	200, 268, 340	Flavonoide

Tabla 13. HPLC del extracto metanólico de *J. pringlei*.

Pico	TR (min)	Absorbancias (nm)	Compuesto
1	2.32	216, 298	Fenilpropanoide
2	3.10	220, 248, 296, 360	ND
3	7.35	204, 288, 324	Flavonoide
4	8.01	204, 276, 332	Flavonoide
5	10.54	205, 268, 280, 370	ND
6	12.25	268, 280, 314, 370	ND
7	14.53	220, 320	Fenilpropanoide
8	16.24	220, 268	Fenilpropanoide
9	20.77	224, 260, 306	Flavonoide

- ND= no determinado

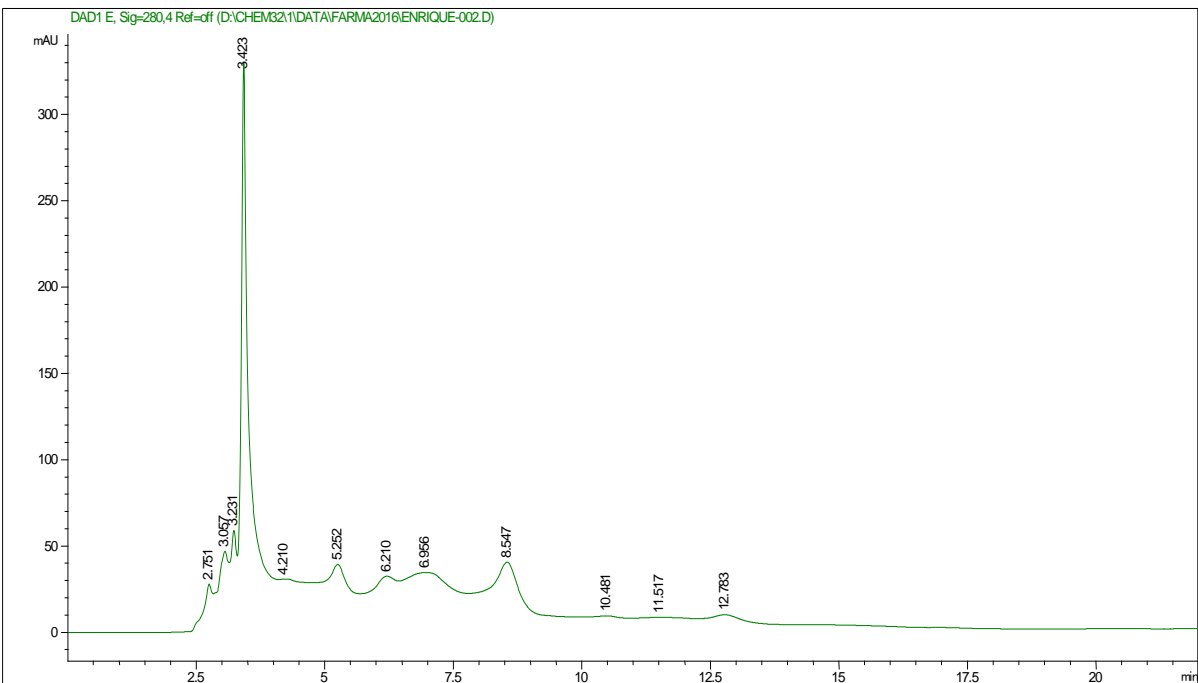


Figura 9. Cromatograma obtenido por HPLC del extracto acetílico de *J. pringlei*.

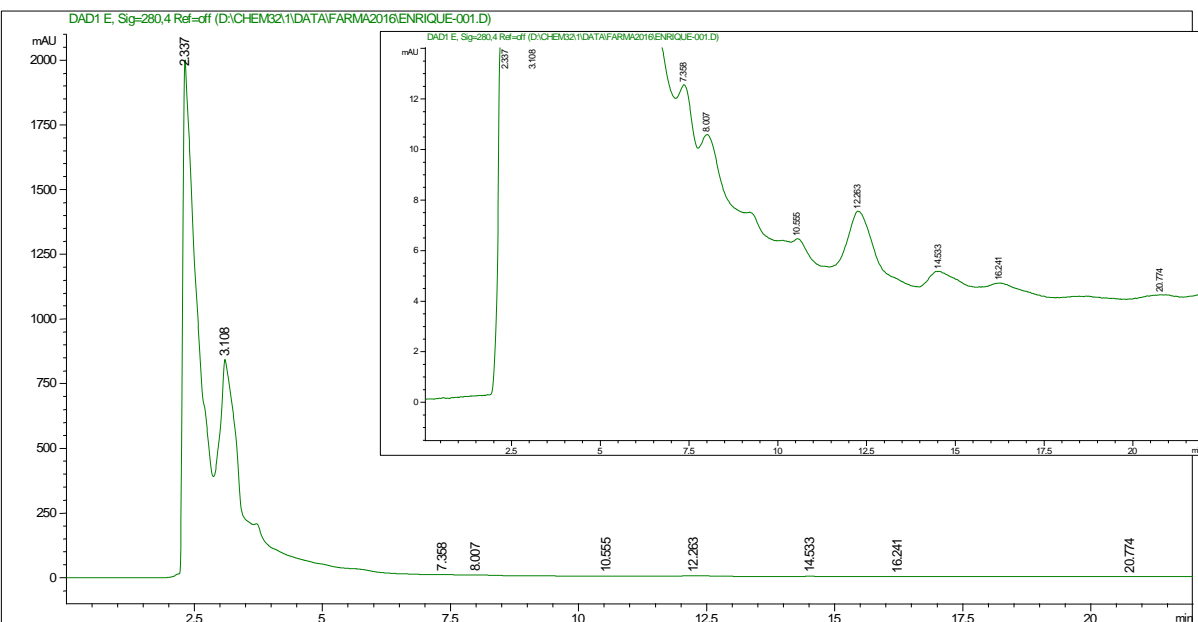


Figura 10. Cromatograma obtenido por HPLC del extracto metanólico de *J. pringlei*.

Cromatografía de gases del extracto hexánico de *J. pringlei* (GC-MS)

En el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se inyectó una muestra del extracto hexánico, de acuerdo con el tiempo de retención y a los patrones de fragmentación (en un lapso de 30 minutos) se lograron identificar cuatro compuestos los cuales fueron corroborados con la librería NIST08.L del espectro de masas (>90%), tal y como se muestra en el cromatograma de la figura 11. En la tabla 14 se muestran los cuatro compuestos identificados: β -cariofileno, 1-nonadecano, eicosano y el Heneicosano, siendo el ultimo el compuesto más abundante con 34.24% del total.

Tabla 14. GC-MS del extracto hexánico de *J. pringlei*.

#	TR (min)	Abundancia (%)	Compuesto	Tipo de compuesto
9	8.155	6.3	β -Cariofileno	Sesquiterpeno
24	13.794	0.74	1-Nonadecano	Alcano
48	20.62	15.89	Eicosano	Alcano
49	23.577	34.24	Heneicosano	Alcano

- # = número de pico, TR = Tiempo de Retención

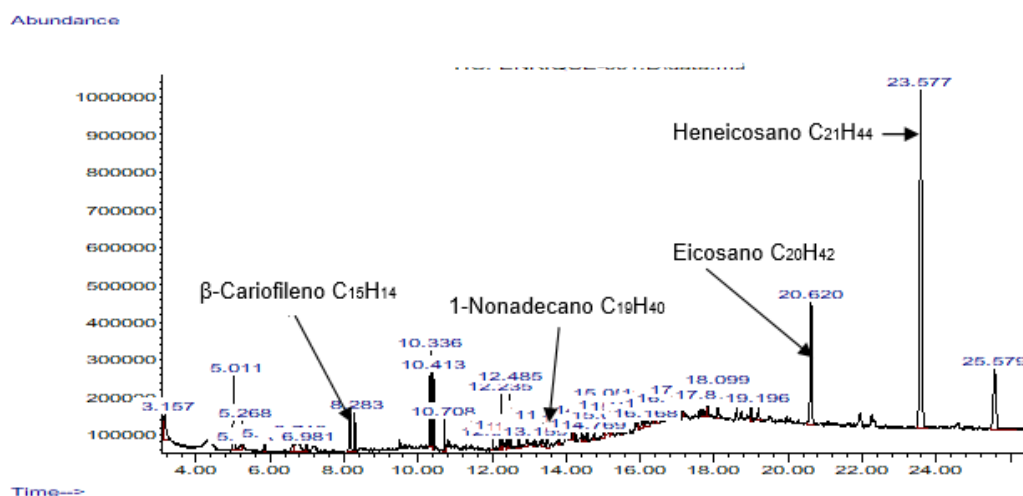


Figura 11. Cromatograma del extracto hexánico de *J. pringlei*.

DISCUSIÓN

Las plantas medicinales han tenido durante años una gran importancia en diversos sectores de la población como medicina alternativa, su uso tradicional ha prevalecido y evidenciado tener efectos contra ciertas enfermedades y padecimientos. Hoy en día existe una disminución en el uso de estos métodos ancestrales en ciertas regiones de la población debido a la extracción y aislamiento de sustancias químicas para la producción de nuevos fármacos (Shilpa, 2010). Sin embargo, hay que recordar que dichas sustancias son aisladas y producidas a partir de compuestos naturales o metabolitos secundarios, los cuales, sirven como base de estudio para crear más medicamentos o mejorar los ya existentes. Los resultados de este proyecto son el primer aporte científico sobre la actividad biológica y el perfil fitoquímico que presentan los extractos de *J. pringlei*.

Obtención de los extractos

El extracto metanólico de *J. pringlei* presentó el mayor rendimiento comparado con los otros dos extractos (tabla 5). En relación con otras plantas reportadas, los niveles de compuestos del metabolismo secundario pueden estar controlados por factores genéticos y por las condiciones ambientales (estrés ambiental, temperatura, humedad, nutrientes, agua, altitud, latitud contaminación o interacciones con otros organismos), sin importar si pertenecen a la misma familia (Jones y Hartley, 1999). Es importante mencionar que la planta fue colectada en temporada seca en el Valle de Tehuacan-Cuicatlan, por tanto, la producción de compuestos que ayuden a proteger la planta de estas condiciones se produce en mayor cantidad. Se ha demostrado que la radiación UV está relacionada con la acumulación de metabolitos secundarios, compuestos fenólicos como flavonoides, ligninas, taninos y cumarinas actúan como filtros, disminuyendo el efecto nocivo de la radiación UV-B sobre el crecimiento y la fotosíntesis (Zhang y Björn, 2009;

Rozema et al., 2002). La variabilidad genética y fenotípica de una especie es un indicador de plasticidad ecológica y la capacidad de respuesta de la misma a los cambios ambientales, juega un papel importante en el comportamiento de las plantas y la producción de metabolitos secundarios ante condiciones favorables y adversas (Cariveau et. al. 2004; Moorey y Foley, 2005).

Evaluación de la actividad antibacteriana

En la evaluación cualitativa (figura 1) se muestra que el extracto acetílico de *J. pringlei* fue el único que presentó actividad antibacteriana en 8 cepas Gram positivas, sin embargo, no se presentó actividad en ninguna Gram negativa. Existen diferencias entre los dos tipos de bacterias ya que las estructuras celulares varían, las bacterias Gram negativas ofrecen mayor resistencia que las positivas a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglucano. Esa membrana es una bicapa lipídica que desempeña un importante papel de barrera frente a determinados antimicrobianos (Nikaido, 2003). Cuando el peptidoglucano es el foco del mecanismo de acción se inhibe la formación de precursores que originan esta membrana, ya que se impide la acción de enzimas vitales como las glucosiltransferasas y transpeptidasas (enzimas PBP) y en consecuencia evitando la elongación del peptidoglucano. Cuando las moléculas que ejercen esta actividad son muy grandes se impide el paso a través de la pared de las bacterias Gram negativas, de forma que solo resultan activas frente a Gram positivos (incluyendo cepas multirresistentes) (Calvo et al., 2009; Sauvage et al., 2008).

En cuanto a la prueba cuantitativa (tabla 6), *M. luteus* fue la cepa más sensible mientras que *S. aureus* 29213 y *S. aureus* CUSI tuvieron menor sensibilidad. Cabe mencionar que las cepas de *M. luteus* y *S. aureus* son agentes que causan infecciones en las heridas de la piel con mayor frecuencia ya que los polisacáridos que conforman la pared bacteriana facilitan su adhesión a los

componentes de la matriz extracelular del tejido objetivo, como la fibronectina y el colágeno (Moffatt, 2005). Rodríguez y colaboradores en el 2017 evaluaron el uso etnomedicinal y las propiedades biológicas de *H. inuloides* (Árnica) sobre cepas de interés clínico, sin embargo, los extractos no presentaron actividad en cepas como *M. luteus* y *S. aureus*. Otros estudios revelan que dicha actividad se puede deber a los sesquiterpenos, ya que Kubo y colaboradores en 1994 aislaron de *H. inuloides* estos compuestos y lo probaron en cepas como *S. aureus* ATCC 12598 y *S. aureus* ATCC 33591 mostrando resultados con una CMI que va de 6.23 a 12.5 µg/mL. Lo anterior se puede comparar con los resultados obtenidos ya que *J. pringlei* y *H. inuloides* (Asteraceae) son conocidos como “árnica” por sus similitudes taxonómicas. El extracto acetílico de *J. pringlei* presentó CMI mayores que las reportadas, esto debido a que en el trabajo realizado por Kubo utilizaron compuestos aislados y no un extracto. Dentro de un extracto hay gran variedad de compuestos, mismos que interactúan simultáneamente y como consecuencia se dan acciones de sinergia (potencializa el efecto antibacteriano) o de antagonismo (disminuye o anula dicho efecto) (Pappano, 2013), lo cual puede dar una premisa del por qué en *M. luteus* si hubo mayor sensibilidad y para *S. aureus* se necesitaron concentraciones altas del extracto.

Curva de crecimiento en *M. luteus*

Como ya se sabe, los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericida (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostático (solo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano) (Martínez, 2008). El efecto del extracto acetílico sobre la curva de crecimiento de *M. luteus* como se observa en la figura 2, muestra un efecto bacteriostático. Como ya se había mencionado, el peptidoglucano puede ser la diana del extracto acetílico, para su formación intervienen diversos mecanismos que van a favorecer o perjudicar su desarrollo, tal es el caso de las autolisinas. Las autolisinas son enzimas líticas que se encargan de la degradación de peptidoglucano, esta membrana esta en constante

renovación, llevándose a cabo un proceso regulado de hidrólisis, cuando se rompe este equilibrio por la acción de un compuesto activo del extracto natural o medicamento se da una sobre activación de las lisinas para finalmente provocar la muerte bacteriana. Sin embargo, cuando una bacteria carece de autolisinas o el principio activo no logra activar este mecanismo, las bacterias no son destruidas solo son inhibidas, por lo que se dice que la bacteria es tolerante (Normark y Normark, 2002; Bayles, 2000). Los resultados nos indican que se logra una disminución bacteriana en la concentración CBM, pero no se da el efecto bactericida, retomando lo dicho por Normark y Bayles, puede ser una explicación lógica a este suceso el hecho de que el extracto no haya activado las autolisinas, no obstante, no hay que descartar la posibilidad de que esto se deba a otros procesos en la pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema génico (Calvo et al., 2009).

Actividad antifúngica en hongos levaduriformes

Diversas especies de levaduras del género *Candida* están distribuidas en la naturaleza y actúan como saprófitos comunes en la microflora humana. Sin embargo, algunas de estas especies de hongos se pueden convertir en patógenos oportunistas y pueden provocar infecciones en diversos sectores del cuerpo como en zonas cutáneas (piel), de mucosas (vagina, esófago, cavidad bucal) y sistemas del cuerpo (torrente sanguíneo) (Papon et al.2013; Webb, 1998). En la cavidad bucal la colonización es significativamente distinta de sitio a sitio, ya que hay sujetos portadores de especies de *Candida*, donde *C. albicans* comprende entre 60% y 70% de los aislamientos y *C. tropicalis* comprende 7% (Totti, 1996).

En la prueba cualitativa en levaduras (figura 3) se observa que los extractos hexánico y acetílico tuvieron actividad antifúngica en las tres cepas utilizadas. Existe una relación entre *J. pringlei* y *A. montana* ya que ambas son conocidas como “árnica” y pertenecen a la familia Asteraceae, se ha reportado que el extracto metanólico de *A. montana* demostró actividad biológica en cepas

levaduriformes como *C. albicans* NTCC 3736 y *C. albicans* F72, esto, debido a la presencia de flavonoides como la galangina y la pinocembrina (Koo, et al., 2000). En otros estudios se ha relacionado la actividad antifúngica con la presencia de lignanos en extractos crudos (Pessini et. al., 2003). Los resultados muestran datos similares ya que el extracto acetílico muestra la presencia de flavonoides y aunque no se sabe con exactitud qué tipo de flavonoides estén, existe la actividad.

En cuanto a las CMI y CFMs, el extracto hexánico mostró mayor efectividad que el acetílico con concentraciones de 0.75 mg/mL y 4 mg/mL respectivamente, esto para las tres cepas utilizadas (tabla 7 y 8). Se han reportado estudios donde han probado los efectos de compuestos fitoquímicos sobre cepas del género *Candida*, los terpenos como el hinokitiol han disminuido el crecimiento de *C. albicans* con una CMI= 5-10 µg/mL y el laurepoxieno en *C. glabrata* con una CMI= 2 µg/mL. En otro caso una cumarina (escopoletina) detuvo el crecimiento de la misma cepa con una CMI de 25 µm/mL y flavonoides como la isoquercitrina y la quercetina contuvieron el desarrollo de *C. albicans* y *C. glabrata* con unas CMI de 2.5 µg/mL y 15.6 µg/mL respectivamente (Lu et al., 2017).

Curva de crecimiento en *C. albicans* 17 MR

El efecto del extracto sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17 MR se observa en la figura 4, se muestra un efecto fungicida, el cual sugiere que el extracto hexánico presenta un efecto de tipo impactos múltiples, lo que es evidente por la pendiente negativa observada desde la segunda y tercera hora de exposición del microorganismo con el extracto. Esto puede ser por la inactivación de una de las vías metabólicas específicas como la síntesis del ergosterol, el foco de acción está unido a la membrana celular del hongo, en donde se forman poros y se permite la permeabilidad de esta, así como la pérdida de proteínas, glucósidos y cationes hasta la muerte celular (Pichardo, 2013). En el caso de algunos medicamentos como los polienos alilaminas y azoles el proceso es similar, ya que el compuesto activo se fija a los esteroides de la membrana de las

células, los cuales tienen gran afinidad al ergosterol de los hongos, teniendo como consecuencia la alteración de la estructura, despolarizando la membrana, por ende aumenta la permeabilidad para la entrada de protones y cationes a la célula para que pierda contenido citoplasmático y finalmente provocar la muerte celular (Allevato et al., 2007).

Actividad antifúngica en hongos filamentosos

En lo referente a el efecto antifúngico en hongos filamentosos, los tres extractos inhibieron el crecimiento radial en las cepas evaluadas, el extracto acetílico fue el más activo ya que detuvo el desarrollo de las 4 cepas, mientras que los extractos hexánico y metanólico no lograron inhibir el crecimiento de *F. sporotrichum* y *A. niger* respectivamente. La importancia clínica de estas cepas se relaciona con el humano, ya que el género *Fusarium* puede aislarse a partir de piel, córnea, esputo, hueso, sangre, etc, provocando enfermedades como queratitis u onicomycosis (Nelson, 1983), el género *Trichophyton* causa enfermedades en la piel como dermatofitosis, mientras que *A. niger* provoca enfermedades en vías respiratorias provocando aspergiloma y aspergilosis pulmonar (Torres et. al., 1991). Existen medicamentos como el fluconazol y el ketoconazol los cuales inhiben el desarrollo de hongos que causan oicomicosis (Westerberg y Voyack, 2013). También se ha demostrado que la presencia de lignanos y ácidos grasos en extractos crudos muestran una actividad fungicida y fungistática en diversos hongos levaduriformes y miceliados (Vargas et al., 2005; Pessini et al, 2003).

El porcentaje de inhibición de los extractos de *J. pringlei* muestra que las cepas que mostraron mayor sensibilidad fueron *F. moniliforme* y *F. sporotrichum*. Los compuestos activos que tienen la acción antifúngica ejercen su mecanismo de acción en la inhibición de la 14-alfa-demetilación del lanosterol en la ruta biosintética del ergosterol, la ausencia de ergosterol y su sustitución por otros esteroides hace que la membrana plasmática presente alteraciones en su

permeabilidad y fluidez (Pontón y Quindós, 2006). Las otras cepas necesitan de una mayor concentración de los extractos, esto se debe a la resistencia de los hongos, que es ocasionado por una variedad de mecanismos como la alteración de enzimas que participan en la síntesis de ergosterol, la disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática al fármaco y las mutaciones: esta acción hace que se expresen genes como el ERG11, el cual provoca que la membrana active una serie de bombas las cuales regulan la expulsión del antifúngico del interior de la célula (Morschhauser, 2002).

Pruebas cualitativas de metabolitos secundarios

En los extractos se encontró la presencia de seis grupos de metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides/triterpenos y monoterpenos. Estudios previos han demostrado que *A. montana* y *H. inuloides* presentan una gran variedad de compuestos como carotenos, cumarinas, flavonoides, glucósidos, alcaloides, taninos, triterpenos y muchos más, los cuales le confieren su actividad antiinflamatoria, antimicrobiana y antifúngica (Rodríguez et al., 2017; Koo et al., 2000; Duke, 1998), a diferencia de lo reportado, *J. pringlei* no presenta alcaloides. La presencia de estos metabolitos secundarios puede estar relacionados con el ambiente de la zona de colecta de la planta, ya que al ser una zona semicálida la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides, lignina, taninos y cumarinas actúan como filtros UV gracias a los anillos bencénicos que conforman sus estructuras químicas, disminuyendo el efecto nocivo de la radiación UV-B sobre el crecimiento y la fotosíntesis (Rozema et al. 2002; Zhang & Björn 2009). La presencia de monoterpenos o sesquiterpenos originan aromas o fragancias y las antocianinas o carotenoides una gran variedad de colores que pueden atraer a polinizadores (Dobson & Bergstrom 2000) los cuales son vitales para su reproducción.

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

El patrón cromatográfico de los extractos acetílico y metanólico muestra que la especie *J. pringlei* es productora de compuestos como fenilpropanoides y flavonoides. La mayor diversidad de estos compuestos se encuentra en partes como las hojas y corteza, estos compuestos cumplen funciones específicas de defensa contra patógenos como bacterias, hongos, parásitos, entre otros organismos y también absorben la radiación emitida por los rayos solares disminuyendo el impacto negativo sobre las plantas (Zhang & Björn 2009; Pessini, 2003). Existe una gran relación entre los resultados de las pruebas biológicas (bacterias y hongos) y los cromatogramas, los cuales muestran la presencia de compuestos de importancia biológica, por ende, se puede relacionar y afirmar la abundancia de compuestos de alta polaridad (extracto metanólico), la inhibición de bacterias Gram positivas (extracto acetílico), de hongos levaduriformes y filamentosos (extractos hexánico, acetílico y metanólico). A pesar del patrón cromatográfico no se puede señalar con precisión que compuesto o compuestos en particular mostraron la actividad biológica ya que se trabajó con una mezcla de diversos compuestos donde pueden interactuar simultáneamente y darse una acción de sinergia o antagonismo (Pappano, 2013). Sin embargo, los datos sirven de preámbulo para desarrollar estudios más a fondo.

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Los resultados obtenidos en el análisis GC-MS realizados al extracto hexánico permite observar la presencia de sesquiterpenos como el Cariofileno, al igual que algunos alcanos o ácidos grasos como el eicosano, heneicosano y el nonadecano. Se han realizado estudios con árnica mexicana (*H. inuloides*) en donde mediante cromatografía de gases se determinó la presencia de compuestos como el Cariofileno, eicosano y heneicosano presentes en los extractos de esta especie (Pérez et al., 2016), estos compuestos son los que le brindan su potencial de aplicación farmacéutica. Esto se puede corroborar, ya que el cariofileno es un

compuesto presente en aceites esenciales de diversas plantas, el cual ha demostrado poseer actividad antifúngica en diferentes hongos levaduriformes y filamentosos (Ricci et. al., 2005). En lo que respecta a los ácidos grasos, son de gran importancia ya que cumplen un papel nutracéutico y como alimento funcional en consumo humano, también desempeñan acciones medicinales como cardioprotectores, antiinflamatorios, entre otros. Los ácidos grasos como el Eicosano y el Heneicosano son potenciadores de compuestos que penetran la piel para llevar a cabo la acción desinflamatoria (Orsavova et al., 2015; Bilia et al., 2006).

Este trabajo muestra resultados relevantes, ya que cabe mencionar que este es el primer estudio sobre la actividad antimicrobiana de la especie *J. pringlei*. Los resultados mostrados indican que el organismo presenta una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales pueden influir de manera importante en la variedad de efectos biológicos mostrados. Los datos mostrados pueden servir de base a estudios posteriores para definir de manera más precisa el por qué solo se tuvo actividad en bacterias gram positivas y determinar de manera más detallada la composición química de los extractos para poder así tener un mayor grado de seguridad que compuestos son los que tienen o ejercen dichas actividades biológicas aislando el compuesto activo.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *J. pringlei* presentó el mayor rendimiento con 12.16%.
- El extracto acetílico de *J. pringlei* presentó actividad antibacteriana en ocho cepas Gram positivas. *M. luteus* presentó la mayor sensibilidad con una CMI de 0.5 mg/mL y CBM de 0.75 mg/mL.
- El extracto acetílico de *J. pringlei* mostró una actividad bacteriostática en *M. luteus*.
- Los extractos hexánico, acetílico y metanólico de *J. pringlei* presentaron actividad sobre tres cepas de levaduras. En el extracto hexánico las tres levaduras tuvieron una CMI de 0.75 mg/mL y una CFM de 1.0 mg/mL siendo las más sensibles.
- El extracto hexánico de *J. pringlei* presentó una actividad fungicida en *C. albicans* 17 MR en una concentración de 1.0 mg/mL.
- El extracto acetílico de *J. pringlei* presentó actividad sobre cuatro cepas de hongos filamentosos.
- Las pruebas colorimétricas muestran la presencia de siete grupos de metabolitos secundarios en los extractos de *J. pringlei*.

- La cromatografía líquida (HPLC) muestran la presencia de flavonoides y fenilpropanoides en el extracto acetílico de *J. pringlei*.
- La cromatografía de gases (GC-MS) del extracto hexánico de *J. pringlei* revela la presencia de compuestos del tipo alcano (1-Nonadecano, Eicosano y Heneicosano) y sesquiterpenos (Cariofileno).
- Los resultados demuestran el efecto antimicrobiano de *J. pringlei* y validan su uso en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

ANEXOS

Anexo 1. GÉNERO *Jefea*

El género *Jefea* contiene un número muy reducido de especies en donde se pueden encontrar a *Jefea brevifolia* (A. Gray) Strother, *Jefea gnaphalioides* (A. Gray) Strother, *Jefea lantanifolia* (Schauer) Strother y *Jefea pringlei* (Greenm.) Strother (Strother, 1991).

Al ser un género poco estudiado se ha estimado la distribución potencial de estas especies mediante el uso de un programa de modelaje bioclimático (BIOCLIM). Para ello se han evaluaron 19 parámetros climáticos y la distribución conocida de las especies obtenida de registros de herbario (Villaseñor, 2004):

J. brevifolia, se distribuye en el norte de México, en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas. Inclusive en parte del sur de Texas en los Estados Unidos.

J. gnaphalioides se registra en el sureste de Coahuila, el suroeste de Tamaulipas, la porción central de San Luis Potosí y la porción central de Hidalgo.

J. lantanifolia se encuentra en la porción oriental de la Altiplanicie Mexicana, con registros en el oeste de Hidalgo, el sur de Nuevo León, San Luis Potosí, el noroeste de Querétaro y el suroeste de Tamaulipas

J. pringlei, a diferencia de las otras tres especies, presenta una distribución más sureña, creciendo en las comunidades xerófilas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en los estados de Oaxaca y Puebla.

Anexo 2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Jefea pringlei (Greenm.) Strother

Clasificación

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Jefea*

Especie: *Jefea pringlei*



Figura 12. *Jefea pringlei*.

Nombre sinónimo: *Zexmenia pringlei*

Nombre común: Árnica

Descripción botánica: Hierba perenne o arbusto pequeño, erecto, con tallos jóvenes muy pubescentes; Hojas simples, opuestas, ovada-deltoides, muy pubescentes, blancos en el envés y tomentosas, de 2.5-3 cm. de largo, enteras o levemente crenadas, de pecíolos cortos; Cabezuelas florales solitarias, terminales, de tallos elongados, cada uno con 9-11 pétalos amarillos.

Distribución: Presenta una distribución orientada hacia el sur, creciendo en las comunidades xerófilas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en los estados de Oaxaca y Puebla y unos cuantos registros en el bosque tropical caducifolio (Villaseñor y Téllez, 2004).

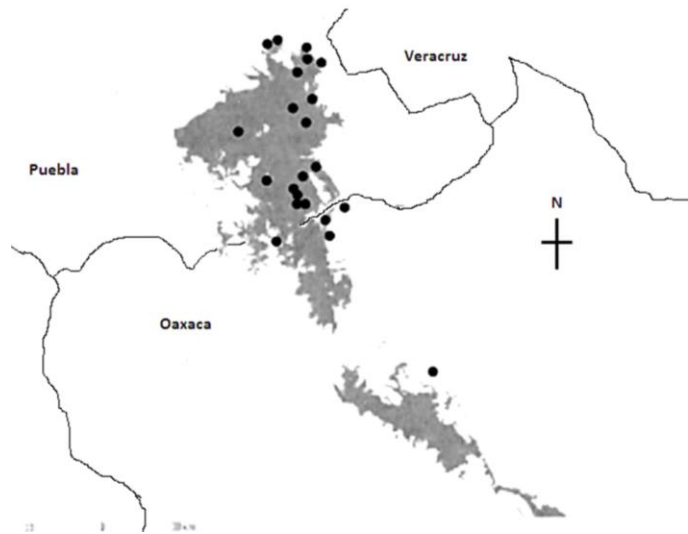


Figura 13: Localización geográfica de *Jefeá pringlei*.

Anexo 3. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE KIRBY-BAÜER (Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945).

Utilizando esta técnica, se evalúan cualitativamente la actividad antibacteriana de los compuestos de un extracto o un compuesto puro, los cuales difunden a través del agar. Si hay compuestos activos, el crecimiento de la bacteria se detiene y se forman halos alrededor del disco. Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. Es importante que el medio alcance 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 del compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición. Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante aproximadamente 24 h. Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de bacteria, antes de retirarlos 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 con agar de Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman N°5. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10 µL del disolvente correspondiente a cada extracto. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocarán en la superficie del agar utilizando una pinza estéril y deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración

de cada extracto a evaluar. Para el control negativo se preparan sensidiscos a los que se les agrega 10 μL del disolvente empleado para disolver el problema. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 μg de cloramfenicol. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo. Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36°C , sin mayor tensión de CO_2 . Es preciso evitar presión de CO_2 debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso de pH. El desarrollo de algunos microorganismos es debido al pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Así mismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

Anexo 4. MICROTÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO (Koneman, 1991)

Con este método se evalúa cuantitativamente la actividad antibacteriana de los extractos o compuesto puro, estos se incorporan al agar a diferentes concentraciones. Se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). La susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica con 96 concavidades (placa de ELISA). La placa se prepara colocando 50 μ L de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL). Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) y se incubó a 35°C durante 24 horas (produciendo una concentración bacteriana de aproximadamente 10^8 UFC/mL) y se diluyeron en caldo Müller-Hinton para obtener una concentración aproximada de 10^5 UFC/mL. En cada una de las 96 concavidades se colocaron 50 μ L de esta suspensión diluida. Como control negativo se colocan 50 μ L de caldo Müller-Hinton con 10 μ L del solvente empleado para disolver el problema. El grupo testigo se prepara colocando 50 μ L de caldo Müller-Hinton en las concavidades y 50 μ L de la suspensión bacteriana (10^5 UFC/mL) Una vez cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con una tapa para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50 μ L de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (DTT). La placa se incuba 30 min.

El uso de sales de tetrazolio provee de métodos alternos indirectos para medir la actividad respiratoria, en este caso en bacterias. La reducción de una sal de tetrazolio causa la formación de un precipitado insoluble de coloración rojiza conocido como formazán. Por lo que, en las concavidades donde se desarrolle organismos, el colorante es reducido a color rojo visible, produciendo un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanece

clara. La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM). En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado.

Anexo 5. EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO (Kubo, et al., 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM obtenidas. Y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la muerte bacteriana. Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. El medio se coloca en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación). Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1 mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se incubará en una estufa a 35°C sin presión de CO_2 . Los extractos o compuestos a evaluar, se prepara en tubos con 10 mL de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de CMI y su múltiplo medio; esto es, la mitad del CMI ($\frac{1}{2}$ CMI) y CBM. Se muestrea cada hora durante los primeros 4 tiempos: T0-0, T1-1, T2-2, T3- 3, T4-4 (tiempo-horas transcurridas), después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 h y finalmente a las 24 h. En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo. Como testigo se prepara un tubo sin extracto. Las cajas se incuban durante 24 h 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 inactivación bacteriana, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

Anexo 6. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL POR DIFUSIÓN EN AGAR (Wang y Bun, 2002)

Este ensayo evalúa cualitativamente la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos de un extracto o un compuesto puro. 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. El método se lleva a cabo en cajas petri que contienen 20 mL de agar papa-dextrosa (PDA), en el cual se inocula el micelio del hongo activamente en crecimiento. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5. Se impregnan con 2 mg del extracto o compuesto puro, disueltos en 10 μ L del disolvente. Los sensidiscos se preparan 24 h 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. Los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Como control negativo se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L de disolvente, y como control positivo se usaron sensidiscos con 7 μ g de ketoconazol, en ambos casos se dejan evaporar durante 24 h (al igual que los experimentales). Se realizan tres repeticiones. Las cajas se incuban a 28°C durante 72 h o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado. 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 con control negativo, también cualquier signo de diferencia de color, esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

**Anexo 7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MEDIA
(CF₅₀) (Método modificado de Wang & Bun, 2002)**

El ensayo mide el efecto antifúngico sobre hongos filamentosos de un extracto o compuesto puro. Se utilizan cajas de 24 pozos y se preparan con el compuesto a evaluar incorporándolo en el agar a determinadas concentraciones. Se coloca en cada pozo 1.5 mL de agar papa-dextrosa (PDA), con las siguientes concentraciones del compuesto a evaluar: 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50 y 0.25 mg/mL. Posteriormente se coloca una pequeña cantidad de micelio en el centro de cada pozo. Por triplicado. Para el control negativo se le agrega al agar el mayor volumen de disolvente usado en los grupos experimentales y se emplea un grupo testigo para comparar la velocidad de crecimiento. Las placas son incubadas a 28°C durante 72 h o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado. 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 representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no 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 (CF₅₀).

Anexo 8. MÉTODOS COLORIMÉTRICOS CUALITATIVOS

Alcaloides: Reactivo Dragendorff y Mayer (Wagner, 2001).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados, estando en la mayoría de los casos el nitrógeno formando parte de un heterociclo. Por la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas pruebas coloridas o de precipitación que sólo son positivas con ciertos grupos de alcaloides, por lo que se han propuesto, para clasificaciones parciales; aunque no son suficientes para una identificación definitiva.

Reactivos para la identificación general de alcaloides:

Reactivo de Mayer: Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y 5 g de KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos disoluciones y se aforan a 100 mL. El reactivo sólo debe añadirse a disoluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos. La disolución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

Reactivo de Dragendorff. Se disuelven 8.0 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 y 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclan las dos disoluciones y se dejan reposar 24 h. Se decanta la disolución y se afora con agua a 100 mL. Se usa sobre disoluciones aciduladas. Se puede recoger el precipitado anaranjado-marrón, liberar los alcaloides con solución de carbonato de sodio y extraerse con éter etílico o un disolvente similar.

Las anteriores disoluciones, preparadas en condiciones específicas, forman parte de los llamados reactivos de alcaloides, aunque los precipitados también pueden ser causados por proteínas, purinas, betaínas, cumarinas y algunos polifenoles.

Como la ausencia de precipitados es indicativa de que no hay alcaloides, se usan estos reactivos como prueba presuntiva de su presencia.

Fenoles: Cloruro Férrico (FeCl_3) (Dey y Harborne, 1989).

Los fenoles son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional hidroxilo. Es un grupo característico de flavonoides y fenilpropanoides.

La prueba del cloruro férrico es una prueba cualitativa para determinar la presencia de fenoles.

Se utiliza una disolución al 1% de cloruro de hierro (III) la cual es neutralizada con hidróxido sódico hasta formar un ligero precipitado de $\text{FeO}(\text{OH})$, que debe ser filtrada antes de usarla. La muestra del extracto se disuelve en agua, metanol o etanol según su solubilidad. Luego se añade la disolución neutra de cloruro férrico: una coloración transitoria o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol.

Anexo 9. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)

La cromatografía es la distribución de los componentes de una muestra entre dos fases, una móvil (gas o líquido) u una fija o estacionaria (líquido o sólido). Los métodos cromatográficos son los procedimientos separativos más utilizados.

- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Es un tipo de cromatografía en columna, se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y a columna cromatográfica. Es muy común en análisis químicos para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes. Los elementos que participan en la interacción en un HPLC son: fase móvil, fase estacionaria y la muestra. En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria. Normalmente un cilindro con pequeñas partículas rodeadas con ciertas características químicas en su superficie, mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluído de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

- Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica de análisis cualitativo la cual tiene su fundamento en la ccf, solo que en este caso la fase móvil, que en la cromatografía clásica es un solvente líquido, es substituida por un gas, como el helio, hidrogeno o nitrógeno. La GC se acopla a un espectrómetro de masas, el cual es un potente detector para un análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras. La espectrometría de masas tiene su fundamento de la ionización de las moléculas en un estado gaseoso, estas convertidas en cationes son aceleradas en un campo eléctrico y luego separadas de acuerdo a su masa. El proceso de ionización suministra de suficiente energía para que las moléculas se rompan en diversos fragmentos los cuales son mostrados en el espectro de masas, que consiste en un gráfico que muestra la abundancia de cada uno de los fragmentos que choca con el detector de masas (Harris, 2001).

LITERATURA CITADA

- Abad, M. J., Ansuategui, M., Bermejo, P. (2007). **Active antifungal substances from natural sources.** *Issue in Honor of Prof. Atta-ur-Rahman. ARKIVOC.* 7: 116-145.
- Allevato, M. A., Negroni, R., Galimberti, R. (2007). **ANTIFÚNGICOS Ayer, hoy y mañana, Educación continua,** *Revista Argentina.* 30 (8): 8-16.
- Bayles, K. W. (2000). **The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery.** *Trends in Microbiology.* 8: 274.
- Beer, E. J., Sherwood, M. B. (1945). **The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances.** *The welcome research laboratories.* 459-467.
- Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Mazzi, G., Vincieri, F. F. (2006). **Development and stability of semisolid preparations based on a supercritical CO2 Arnica extract.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41; 449–454.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). **Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.** *Plant Science,* 161: 839-851
- Calvo, J., Martínez, L. (2009). **Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica.** *Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.* 27(1): 44-52.
- Cariveau, D., Irwin, R. E., Brody, A. K., Garcia, M. L. S., Von Der Ohe A. (2004). **Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection of plant and floral traits.** *Oikos* 104: 15-26.
- Carson, R. T., Larson E., Levy S. B., Marshall, B. M., Aiello, A. E. (2008). **Use of antibacterial consumer products containing quaternary ammonium compounds and drug resistance in the community.** *Journal of Antimicrobial Chemother.* 62 (5): 1160–2.

- Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J. L., Caballero, J., Cortés, L., Dávila, P., Lira, R., Rodríguez, I. (2001). **Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México.** *Economic Botany*. 55 (1): 129-166.
- Castelo, E., Ricalde, O., Panero, J. (2005). **Catálogo de Autoridades de Asteráceas Mexicanas y Actualización de tribus *Heliantheae* y *Eupatorieae*.** University of Texas. Base de datos SNIB-CONABIO proyectos V004, AE012 y CS011. Mexico, D.F.
- Cole, M. D. (1994). **Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays –a critical review.** *Biochemical Systematic and Ecology*. 22 (8): 837-856.
- CONABIO. (2000). **Estrategia nacional sobre biodiversidad de México.** Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- De la Cruz, M. (1552). **Libellus de Medicinabilis Indorum Herbis. Códice de la Cruz-Badiano.** México reprinted in 1996. FCE. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- De las Heras B., Slowing, K., Benedi, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C. (1998). **Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador,** *Journal of Ethnopharmacology. Ecuador*. 61: 161–166.
- Dey, P. M., Harbone, J. B. (1989). **Methods in plant biochemistry.** Academic Press Limited. 1: 552.
- DOBSON, H., BERGSTROM, G. (2000). **The ecology and the evolution of pollen odours.** *Plant Syst. Evol.* 222: 63-87.
- Domínguez, X. A. (1979). **Métodos de la Investigación Fitoquímica.** Ed. Limusa. México. 45-47.
- Duke, A. J., J. M. Bogenschutz-Godwin. (1998). **Handbook of Medicinal Herbs.** Second Ed. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 896.
- Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes, A. M., Burton, G. (1985). **Introducción al estudio de los productos naturales.** Secretaria general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 25-31.

- Goossens, A., Häkkinen, S., Laakso, I., Seppänen Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A. M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inze, D., Oksman-Caldentey, K. (2003). **A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells.** *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100: 8595-8600.
- Haq, N. (2004). **In vitro production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants**, [en línea] En: [consulta: 12 octubre 2004].
- Harris, C. D. (2001). **Análisis químico cuantitativo.** Versión Española por Vicente Berenguer Navarro, Ángel Berenguer Murcia. 2da edición Barcelona. México. Reverte. 674: 693-694.
- Hladun, N. P., Bondarenko, A. S., Nahorna, S. S., Smyrnova, O. V. (2002). **Investigation of the activity of the preparation cerbiden against *Candida spp.*** *Mikrobiol Z. Colombia.* 64 (6): 57-61.
- Jones, C. G., Hartley, S. E. (1999). **A protein competition model of phenolic allocation,** *Oikos* 86: 27-44.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. (1991). **Diagnóstico microbiológico.** Ed. Médica Panamericana. México. 909.
- Koo, H., Gomesa, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K., Cury, J. A. (2000), **In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens.** *Archives of oral biology.* 141-148.
- Kubo, I. (1993). **Antimicrobial activity of green tea (layer components. In: Bioactive volatile compounds from plants.** Edited by Teranishi, R. and Buttery, R.G. American Chemical Society Washington, D.C. USA. 57-70.
- Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chaudhuri, S. K., Sánchez, Y., Ogura, T. (1994). **Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*.** *Planta Medica.* 60: 218–221.
- Lord, S. (2011). **Antimicrobial resistance: animal use of antibiotics.** Oxford Textb. Zoonoses Biol. Clin. Pract. Public Heal. Control. Oxford University Press. 38–42.

- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V. (2012). **Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.** *Lancet*. 2095–2128.
- Lu, M., Li, T., Wan, J., Li, X., Yuan, L., Sun, S. (2017). **Antifungal effects of phytocompounds on *Candida* species alone and in combination with fluconazole.** *International Journal of Antimicrobial Agents*. 49: 125-136.
- Martínez, M. L. (2008). **Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 26: 481.
- Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G. (2002). **Bioquímica.** 3a ed. Addison Wesley. España. 166-170.
- Moffatt, C. (2005). **Identificación de los criterios de infección en heridas.** Medical Education Partnership. 2-5.
- Morschhauser, J. (2002). **The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1587:240-248.
- Moorey, B. D., Foley, W. J. (2005). **Tree use by koalas in a chemically complex landscape.** *Nature*. 435: 488-490.
- Nelson, P. E., Toussoum, T. A., Marasas, W. F. O. (1983) ***Fusarium* species. An illustrated manual for identification.** *University Park:* Pennsylvania State University Press.
- Nikaido, H. (2003), **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 593–656.
- Normark, H. B., Normark, S. (2002). **Antibiotic tolerance in pneumococci.** *Clinical Microbiology and Infection*. 8: 22-61.
- O.M.S. (2000). **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine,** Ginebra. 1.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R. (2015). **Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake**

- and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids.** *International Journal of Molecular Sciences*. 16. 12871–12890.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., Bennett, R. J. (2013). **Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm.** *PLoS Pathogens*. 9: 1003550.
 - Pappano, A. J. (2013). **Fármacos antagonistas de los receptores colinérgicos.** *Farmacología básica y clínica*. 12^a ed., China: McGraw-Hill Interamericana. 115-128.
 - Parejo, I., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2005). **Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes máxima*.** *Phytochemistry*. 66: 2356–2362.
 - Pérez, G., S., J., Bermúdez, C., P., S., Gallegos, A., A., Rodríguez, R., J., Iqbal, N., M., H., Saldivar, P., R. (2016). **Identification of bioactivity, volatile and fatty acid profile in supercritical fluid extracts of mexican arnica.** *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 1-10.
 - Pessini, G. L., Díaz, F. B. P., Nakamura, C. V., Cortez, D. A. (2003). **Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.)** Yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98: 1115-1120.
 - Pichardo, L., Ramírez, A. (2013). **Actividad antimicrobiana de *Caesalpinia melanadenia* (Rose) Standl,** Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, México.
 - Pontón, J., Quindós, G. (2006). **Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica.** *Medicina Clínica (Barcelona)*. 126 (Suplemento 1): 56-60.
 - Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Epifanio, F., Burini, G. y Curini, M. (2005). **Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae),** *Phytochemistry*. 98: 195-200.
 - Ríos, J. L., Recio, M. C. (2005). **Medicinal plants and antimicrobial activity.** *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 80–84.

- Rodríguez, C. J. L., Verónica, E., Edelmira, L., Robert, B., Tzasna, H., Francisco, J., Espinosa, G., Guillermo, D. (2017), **Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties**, *Journal of Ethnopharmacology*. 195: 39-63.
- Rozema, J., Lo Björn, J. F., Bornman, A., Gaberscik, D. P., Hader, E. T. (2002). **The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 66: 2-12.
- Russell, A. (2003). **Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations**. *The Lancet Infectious Diseases*. December. 3 (12): 794–803.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., Charlier, P. (2008). **The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis**. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*. 32: 234–58. Fe de errores en: *FEMS Microbiol Rev.* (2008); 32: 556.
- Sepúlveda, J. G., Porta D. H., Rocha S. M. (2003). **La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas**. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3): 355-363.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B. S. (2010). **An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture**. *Journal of Plant Science*. 5: 222-247.
- Singh, S., Sharma, P., Vats, L. (1987). **Light dependent toxicity of the extract of plant *Tagetes erecta* and α -terthienyl toward larvae of mosquito *Culex tritaeniorhynchus***. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (1): 81-88.
- Soto, R. G., Vega, A. L., Tamajón, D. C. (2002). **Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (caña santa)**. *Revista Cubana Plantas Medicas*. 7: 89-95.

- Strother, J. L. (1991). **Taxonomy of Complaya, Elaphandra, logeton, Jefea, Wamalchitamia, Wedelia, Zexmenia, and Zyzyxia (Compositae-Heliantheae-Ecliptinae)**. Systematic Botany Monographs 33: pp. 1-111.
- Torres, R. J. M., Brunet, M. I. (1991). **Aspergilosis sistémica. Monografía clínica en Enfermedades Infecciosas**. Micosis sistémicas. Doyma; Cap. 9: 59-69.
- Totti, M. A. G., Jorge, A. O. C., Dos Santos, E. B., De Almeida, O. P., Scully, C. (1996). **Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats**. *Journal of Oral Pathology Medicine*. 25: 308-310.
- Tukari, (2011). En: **Medicina tradicional indígena: efectividad a prueba**, XXVIII Reunión Plenaria del Congreso Nacional Indígena Región Centro Pacífico, Guadalajara, México. 2.
- Turner, B. L., Nesom, G. L. (1993). **Biogeography, diversity, and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae**. En: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. y Fa J. Eds. Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution, Oxford University Press, Nueva York. 559-575.
- Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J. (1991). **Screening methods for antibacterial agents from higher plants**. In: Hosttrttman, K. (Ed). Methods in plant Biochemistry. Assay for bioactivity. Vol. 6. Academic Press. London. 47-69.
- Vargas, A. I., Reyes, B. R., Rivera, C. G., Martínez, T. M. A., Rivero, E. I. (2005). **Antifungal lignans from the creosotebush (*Larrea tridentata*)**, *Industrial crops and products an international journal*. 22: 101-107.
- Villaseñor, J. L. (2003). **Diversidad y distribución de las *Magnoliophyta* de México**. *Interciencia* 28: 160-167.
- Villaseñor, J. L., Téllez, V. O. (2004). **Distribución potencial de las especies del género *Jefea* (Asteraceae) en México**. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*. 75 (2): 205-220.
- Wagner, H. (2001). **Plant drug analyses. Second edition**. Springer. Germany. 15-29.

- Wang, H., Bun, T. N. (2002). **Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits.** *Phytochemistry*. 61: 1-6.
- Webb, B. C., Thomas, C. J., Willcox, M. D. P., Harry, D. W. S., Knox, K. W. (1998). **Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review.** Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. *Australian Dental Journal*. 43: 45-50.
- Westerberg, D., Voyack, M. (2013). **Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment.** *American Family Physician Journal*. 88: 762–770.
- Zhang, W. J., Lo Björn. (2009). **The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants.** *Fitoterapia*. 80: 207-218.