



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE  
*Haematoxylon campechianum*”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGA**

PRESENTA

**KARINA PEDRAZA CERVANTES**

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. MARISOL AVILA ROMERO

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.



ABRIL, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM porque me ha formado profesionalmente y fue mi amada segunda casa.

A la FESI sin duda alguna mi casa, me enfrentó a mi misma y a las capacidades que he tenido y desarrollado desde que llegué a ella.

A la carrera de Biología por el apoyo en esta última etapa, por tener a docentes muy bien preparados y que comparten su conocimiento y experiencias haciendo que por medio de ellas se ame más la carrera.

A la profesora Marisol porque desde el día uno supe que estaría conmigo hasta el final, por ser un gran ser humano y porque nadie hubiese sido mi mejor guía. Gracias por la paciencia, el cariño, el apoyo, el ánimo y el tiempo.

## DEDICATORIAS

A mis padres, **Felipa y Alfonso**:

Porque son y serán siempre los pilares más fuertes en mi vida, por qué jamás me dejaron caer a pesar de las circunstancias, porque con su esfuerzo y amor nos han sacado adelante a mis hermanos y a mí, porque siempre me quieren ver cumplir mis sueños, mis metas y superarme. Porque los amo.

A mi hermana comadre, Gaby:

Gracias a ti, a tu ayuda, a tu acompañamiento, a tu tiempo, a tu cariño, a tu paciencia, a tu amor para mí y para con mi gordo es porque este objetivo se cumplió. Gracias te amo hermana.

A mis hermanos, José y Ale:

Por ser el mejor ejemplo siempre, por apoyarme en todos los sentidos, por aguantar mi histeria, por estar presentes en cada lágrima de felicidad de tristeza o impotencia. Porque se que nunca me dejarán caer y si eso pasa, me darán la mano para levantarme y comenzar de nuevo. Gracias.

A Ricardo “chango”, mi hermano mayor:

Porque tú antes de irte aclaraste mi camino profesional, te lo he agradecido desde el primer día, siempre creíste en mí y en lo capaz que era para hacer las cosas, porque te lo debo, te la debo a tí. Porque se que cuando nos reunamos me vas a decir “yo te lo dije tonta”. Para tí, hasta el cielo.

A mi hijo y su papá, Julián y Carlos Andrés:

Porque son mi familia, porque desde que inicie la carrera has estado presente Carlos, porque fuiste mi comienzo, o mejor dicho mi reinicio, porque desde 2018 construimos un hogar y porque en él crece el principal motivo que mueve mi vida, mi hijo, Julián. Los amo con todo mi ser.

A mis sobrinas Izti y Anita:

Simplemente porque las amo inmensamente, soy su ejemplo a seguir, lo se porque Itzi un día me dijo que ella quería ser como yo, y estudiar como yo lo hacía. Las amo.

A Lili, Fany y Fer:

Se que han estado presentes en los eventos importantes en mi vida, por ello están aquí, gracias por su amistad, gracias por los consejos, la aventuras y por todo lo que se viene. Están siempre presentes en mi corazón.

A la Fer:

Martell Martell Martell, tú sabes lo mucho que te agradezco, llegaste en el momento preciso para llenar mi vida de tonterías (bonitas claro). Gracias güera por el apoyo que me has brindado siempre. Te adoro.

Toño, Dianita, Fri, Ernesto, Dani, Cinthya, Mafer, Isma, Gelitos, gracias por estar en este proceso en el que en algunos momentos se tornó muy muy difícil. Son el ejemplo vivo que en la carrera se pueden encontrar personas que brinden apoyo sincero e incondicional, mil gracias.

*Arcángel Haniel*

*I call upon you now*

*I ask for wisdom, during times of despair*

*Give me strength to drive through the storm*

*Guide me to find tomorrow 's rainbow shows me that the soul 's joy is the pot of gold*

**AMEN**

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>4</b>
<b>Área de colecta</b>	<b>6</b>
<b>Justificación</b>	<b>10</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>10</b>
<b>Objetivos</b>	
Objetivo general	<b>10</b>
Objetivos particulares	<b>11</b>
<b>Metodología</b>	
1. Colecta del material	<b>11</b>
2. Determinación taxonómica	<b>11</b>
3. Obtención de los extractos	<b>11</b>
4. Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios	<b>12</b>
5. Obtención de los microorganismos	<b>12</b>
6. Actividad antimicrobiana	
6.1. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	<b>13</b>
6.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana	<b>13</b>
6.3. Efecto del extracto sobre la curva de sobrevivencia	<b>13</b>
7. Actividad antifúngica	
7.1. Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antifúngica para levaduras	<b>13</b>
<b>Resultados</b>	<b>14</b>
<b>Discusión</b>	<b>24</b>
<b>Conclusión</b>	<b>29</b>
<b>Referencias</b>	<b>30</b>
<b>Anexos</b>	
Anexo I: Difusión en Agar Kirby-Bauer.	<b>33</b>
Anexo II: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM).	<b>33</b>
Anexo III: Curva de sobrevivencia.	<b>34</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1 Datos etnobotánicos de <i>H. campechianum</i> .	<b>14</b>
Cuadro 2 Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>H. campechianum</i> .	<b>15</b>
Cuadro 3 Principales grupos de metabolitos secundarios del extracto metanólico y acetónico de <i>H. campechianum</i> .	<b>16</b>
Cuadro 4 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos metanólicos de <i>H. campechianum</i> sobre cepas Gram positivas.	<b>19</b>
Cuadro 5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos metanólicos de <i>H. campechianum</i> sobre cepas Gram negativas.	<b>20</b>
Cuadro 6 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos acetónicos de <i>H. campechianum</i> sobre cepas Gram positivas.	<b>21</b>
Cuadro 7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos acetónicos de <i>H. campechianum</i> sobre cepas Gram negativas.	<b>22</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1	Municipio de Teapa, Villahermosa Tabasco. <span style="float: right;"><b>7</b></span>
Figura 2	<i>Haematoxylon campechianum</i> . <span style="float: right;"><b>9</b></span>
Figura 3	Actividad antibacteriana de los extractos metanólico y acetónico de <i>H. campechianum</i> en bacterias Gram positivas. <span style="float: right;"><b>17</b></span>
Figura 4	Actividad antibacteriana de los extractos metanólico y acetónico <i>H. campechianum</i> en bacterias Gram negativas. <span style="float: right;"><b>18</b></span>
Figura 5	Curva de mortalidad del extracto acetónico de <i>H. campechianum</i> sobre la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 29213 durante 24 horas. <span style="float: right;"><b>23</b></span>
Figura 6	Curva de mortalidad del extracto acetónico de <i>H. campechianum</i> sobre la cepa <i>E. gergoviae</i> ATCC 33028 durante 24 horas. <span style="float: right;"><b>24</b></span>

## LISTA DE ABREVIATURAS

CBM	Concentración bactericida mínima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CFM	Concentración fungicida mínima
MH	Mueller Hinton
PDA	Agar papa dextrosa
UFC	Unidades formadoras de colonia
TTC	Cloruro de tetrazolio



## RESUMEN

El empleo de las plantas medicinales con fines terapéuticos se basa en elaborar diversas preparaciones entre las que destacan infusiones, ungüentos y aceites, mediante la aplicación de éstos se favorece la cura de algunos padecimientos. En México, una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional es *Haematoxylon campechianum*. Varias comunidades de Tabasco emplean la infusión del tronco para tratar malestares estomacales. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de *H. campechianum*. Los extractos fueron obtenidos a partir del tronco, mediante la técnica de maceración en tres solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol) y concentrados a presión reducida. A estos se les realizaron pruebas colorimétricas para detectar los principales grupos de metabolitos secundarios como son: alcaloides (Dragendorff y Mayer), fenoles (solución de cloruro férrico al 1%), glicósidos (Prueba de Molisch), terpenos (Vainillina-HCl), saponinas (prueba de la espuma) y flavonas (prueba de Shinoda). La actividad antimicrobiana cualitativa de los extractos se realizó con la técnica de Kirby-Baüer para bacterias (20 cepas) y levaduras (3 cepas). Para determinar la CMI y CBM se empleó el método de microdilución en caldo. La curva de supervivencia bacteriano se realizó en 9 tiempos por un periodo de 24 horas en las cepas que resultaron más sensibles. Los resultados de este estudio muestran que los extractos de *H. campechianum* acetónico y metanólico presentan fenoles, terpenos y flavonas. Por otro lado, 8 cepas Gram positivas y 5 cepas Gram negativas resultaron sensibles a los extractos metanólicos y acetónicos de éstas las mejores CMI y CBM fueron *S. aureus* con el extracto metanólico con valores de CMI=0.125 y CBM=0.25 mg/mL; una CMI=0.5 y CBM=0.75 mg/mL para *V. cholerae*; con el extracto acetónico una CMI=0.06 y CBM=0.125 mg/mL para *S. aureus*, y finalmente una CMI=0.25 y CBM=0.5 mg/mL para *E. gergoviae*. De acuerdo a las curvas de supervivencia en este estudio se puede observar que el extracto acetónico presentó actividad bacteriostática a concentraciones de la CBM, frente a las cepas *E. gergoviae* (0.75 mg/mL) y *S. aureus* (0.125 mg/mL). El extracto hexánico no presentó actividad en ninguna de los microorganismos utilizados (bacterias y hongos). Los extractos metanólico y acetónico de *H. campechianum* tienen actividad antibacteriana en cepas de importancia clínica.

## INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus estadísticas reporta que las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial, para satisfacer o complementar sus necesidades médicas (Ocegueda *et al.*, 2005).

En México, alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir, más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. El empleo de este tipo de plantas medicinales con fines terapéuticos se basa en la aplicación de diversas preparaciones entre las que destacan las infusiones, cocimientos, emplastos, ungüentos y aceites que mediante la aplicación de estos se favorece la cura de algún padecimiento (Cortez *et al.*, 2004). Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que generalmente son metabolitos secundarios (MS) que contienen las plantas se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies (Ocegueda *et al.*, 2005).

Las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos conocidos como MS, su diversidad es comparable con el número de especies vegetales. Estas sustancias pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras. Su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad (Ocegueda *et al.*, 2005). Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés, como parte de la protección química utilizada por las plantas está la producción de estos MS en contra de herbívoros, o con actividad antimicrobiana o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000).

La síntesis de los MS se puede inducir cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el ataque por herbívoros, por microorganismos (virus, bacterias y hongos), la competencia por el espacio de suelo, luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y la exposición a la luz solar (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). La producción puede conferir al organismo productor un incremento en las posibilidades de sobrevivencia, a través de la interacción que se dan del medio con otros organismos (Waterman, 1992).

La búsqueda de MS con fines farmacológicos comenzó a dar un giro importante a nivel mundial, teniendo como objetivo la investigación de compuestos contra hongos, virus o cepas bacterianas resistentes a antibióticos. La identificación, caracterización biológica y molecular de microorganismos son útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, esto ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna ya que juegan un papel importante en el control de enfermedades y en las respuestas de defensa.

La resistencia a los antibióticos afecta a todos los países ya que los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacorresistentes corren mayor riesgo de tener peores resultados clínicos y morir, además de consumir más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias. Es por ello que son necesarias más inversiones e innovaciones en la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos (OMS, 2017).

En nuestro país se estima que existen cerca de 3, 103 especies de plantas que son usadas en la medicina tradicional mexicana, casi un tercio son empleadas para tratar malestares del tracto digestivo, 473 especies para padecimientos estomacales, 247 para enfermedades respiratorias y 277 para enfermedades cutáneas. De las cuales destacan ya que algunas especies como *Bursera simaruba* (copalillo), *Calophyllum brasiliense* (cedro cimarrón), *Mammea americana* (mamey) y *Haematoxylum sp.* (tinto) por tratar malestares del tracto digestivo (Kakuko *et al.*, 2005; Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

El género *Haematoxylon* es ampliamente valorado por sus propiedades farmacológicas. En la medicina tradicional mexicana se emplea la infusión del tronco para el tratamiento de padecimientos del sistema cardiovascular, tales como ritmo cardíaco acelerado, mareos y desmayos. En Baja California Sur y en el Estado de México, la decocción del centro del tallo se emplea para controlar la presión arterial y aliviar algunos padecimientos cardiacos. En el Estado de Morelos la decocción de la corteza se usa para purificar la sangre y en combinación con *Citrus sp.* (limón, naranja) se emplea para disminuir el nerviosismo (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

En el centro del país, Estado de México, Morelos e Hidalgo, la infusión de la corteza y el tronco de las plantas del género *Haematoxylon sp.* se emplean para aliviar padecimientos

renales, y algunos malestares estomacales, los que incluyen dolor, diarrea y úlcera gástrica. La infusión de las flores se emplea para aliviar dolores de espalda, tos y resfriado. Asimismo, es apreciada por sus propiedades astringentes y con suma frecuencia utilizada para disminuir los ataques epilépticos, controlar la diabetes y disminuir la fiebre (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

## ANTECEDENTES

El género *Haematoxylon* presenta dos especies: *H. brasiletto* y *H. campechianum*.

### ***Haematoxylon campechianum***

- En el año de 1994 El-Sayed y cols., mediante pruebas cromatográficas y espectroscópicas lograron identificar 19 ácidos fenólicos de los cuales es 1,2,3,4,6 – pentagalioil glucosa la molécula característica. En este estudio se utilizaron ramas para la obtención de los extractos y tres tipos de solventes con diferente polaridad (éter, metanol y alcohol etílico).
- Kandil y cols., en 1996, mencionan la presencia de flavonoides y terpenos, en el estudio se trabaja con el extracto de hojas en acetona al 80% y mediante pruebas espectroscópicas y cromatográficas se lograron aislar dos nuevos galotaninos 2,6-*bis-O-digaloil-3-O-galioilglucosa* y 2-*O-trigaloil-1,3,6,6-tetraquis-O-galioilglucosa*. Los estudios mencionados fueron realizados en Egipto.
- Masuda y colaboradores en 1991 mediante estudios cromatográficos lograron identificar a partir del extracto de duramen, la hematxilina, un reactivo de tinción ya aislado de *H. campechianum*. Además de obtener dos nuevos derivados 3, 4, 10, 11-*tetra-hidroxi-7, 8-dihidro-6H-dibenzo [b, d] oxocin-7* y 7-*hidroxi-3, 4, 10, 11-tetrametoxi-7, 8-dihidro-6H-dibenzo [b, d] oxocin-7-metanol*.

Cabe señalar que no se reportan estudios de *H. campechianum* en lo que respecta a su actividad antimicrobiana.

## ***Haematoxylon brasiletto***

- Martínez-Luna en 2001, realizó la investigación química y la evaluación del potencial antimicrobiano de la raíz de *Lostephane heterophylla* (Cav.) Benth. (Asteraceae) y la corteza de *H. brasiletto* Karst. (Leguminosae). De este último se lograron aislar e identificar ocho MS (hematoxilina, brazilina, ácido caféico, galato de metilo, ácido gálico, floroglucinol, ácido 4-hidroxicinámico y 5-metoxisoraleno) mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos. Por otro lado los compuestos hematoxilina, brazilina, ácido caféico y floroglucinol aislados de esta misma especie presentaron actividad contra *S. aureus*, *E. faecium* y *E. coli*.
- García y colaboradores en 2005 mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas determinaron los efectos de los extractos de *H. brasiletto* sobre el crecimiento, la producción y la adhesión de *V. cholerae* en células de ovario de hámster chino. La purificación parcial de la fracción activa sugiere que los polifenoles pueden desempeñar un papel en la actividad antimicrobiana exhibida por los extractos y como resultados para el crecimiento reportan una CBM de 0.3-0.4 mg/mL y nula formación de enterotoxina.
- Zarco-Espinosa en 2010 mediante métodos cuantitativos determinó que el extracto de *H. brasiletto* posee una CMI de 256 µg/mL y 412 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Además el extracto activo fue sometido a un fraccionamiento por partición. Como resultado de este proceso se obtuvo una fracción activa (AcOEt) con CMI de 150 y 103 µg/mL para *S. mutans* y *P. gingivalis*, respectivamente. La fracción resultante de la partición fue sometida a un fraccionamiento por cromatografía de columna abierta, de la cual se purificó el compuesto mayoritario, mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia y este fue identificado como hematoxilina.
- Heredia y colaboradores en 2005 evaluaron los extractos de 33 plantas para evaluar sus efectos sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7, determinando que el extracto de *H. brasiletto* fue el único que inhibió el crecimiento bacteriano con una CBM 4 mg/mL. Se destaca que la purificación parcial de la fracción activa sugirió que los polifenoles podrían desempeñar un papel en la actividad antimicrobiana determinada por los extractos de *H. brasiletto*.
- Rivero-Cruz en 2008 evaluó los efectos antimicrobianos del extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto*, utilizando 12 bacterias y una levadura, *C. albicans*. Los resultados indicaron que el extracto inhibió el crecimiento de ocho de los

microorganismos a un límite de concentración de 128 µg/mL. Para los compuestos evaluados, hematoxilina y brazilina, los valores de CMI oscilaron entre 8.7 y 128 µg/mL.

## ÁREA DE COLECTA

Niembro, 1983; Geilfus, 1989 y Timyan, 1996

*H. campechianum* fue colectada en el municipio de Teapa que se localiza en la región de la sierra y tiene como cabecera municipal a la ciudad de Teapa, la que se ubica al sur del estado de Villahermosa Tabasco entre los paralelos 17°32' de latitud norte y los 92°57' de longitud oeste. Colinda al norte con los municipios de Centro y Jalapa, al sur con el estado de Chiapas, al este con los municipios de Jalapa y Tacotalpa, al oeste con el estado de Chiapas. Integra, junto con los municipios de Macuspana, Tacotalpa y Jalapa, la llamada región de la Sierra, por las bellezas naturales que rodean a la cabecera municipal se le conoce como "La Sultana de la Sierra".

El municipio se encuentra en una zona intermedia entre la planicie pluvial y la sierra de Tabasco, predominando las sierras bajas con ligeras pendientes. Se encuentra en la región hidrológica Grijalva-Usumacinta, dentro de la cuenca del Grijalva-Villahermosa.

El clima es cálido húmedo con lluvias todo el año; tiene una temperatura media anual de 27.8°C, siendo la máxima media mensual en junio con 31.7°C y la mínima media en diciembre con 23.9°C. La máxima y la mínima absoluta alcanzan los 50°C y 7°C, respectivamente.

El régimen de precipitaciones se caracteriza por un total de caída de agua de 3,862.6 mm, siendo un promedio máximo mensual de 569.7 mL en el mes de septiembre y una mínimo mensual de 167.4 en el mes de abril.

La mayor parte de la superficie está clasificada como suelos gleysoles, los cuales presentan texturas arcillosas con excesos de humedad por drenaje deficiente. En la región central y en las márgenes de los ríos se tienen fluvisoles, los cuales son suelos francos y de buena fertilidad. Al sur se presentan los acrisoles que son suelos arenosos, ácidos y de baja fertilidad. El patrón de drenado de los suelos se caracteriza por seguir de manera general una dirección de sur a norte.



Figura 1. Municipio de Teapa, Villahermosa Tabasco.

Fuente: (Hernandez *et al.*, 2016)

[www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM27tabasco/municipios/27016a.html](http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM27tabasco/municipios/27016a.html)

## DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Haematoxylon campechianum* L.

Hernandez *et al.*, 2016

### *Haematoxylon campechianum* L.

Familia: Fabaceae

Sinónimos: *Haematoxylon lignum*; *Lignum campechianum*; *Lignum coruleum*

- NOMBRES COMÚNES

Campeche, tinto, palo de campeche, palo de tinte (México); brasil (Honduras); palo de brasil (Nicaragua, Venezuela); palo negro (Cuba); bois campeche, campecheir (Haití); palo azul, palo de tinta, brasilete, brasilito (Colombia).

- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol espinoso perennifolio, con alturas de 10 a 15 m y diámetro de 45 a 80 cm; fuste acanalado, nudoso y retorcido: copa redondeada con las ramas ascendentes y torcidas. La

corteza es de color pardo grisáceo a pardo amarillento, escamosa, dividida en piezas pequeñas y cuadradas o longitudinales. El grosor total de la corteza varía de 2 a 8 mm.

Hojas compuestas, dispuestas en espiral, paripinnadas, de 3 a 10 cm de largo con tres a cuatro pares de folíolos sésiles de 1 a 3 cm de largo y de 0.8 a 1.8 cm de ancho, cuneiformes, con el margen entero, ápice truncado a emarginado, con base cuneada a redondeada; haz verde limón y brillantes, envés verde pálido, ambas superficies glabras.

Inflorescencias en racimos axilares y terminales de hasta 10 cm de largo, escasamente pubescentes; flores de 5 a 7 mm de largo, zigomorfas; cáliz con cinco sépalos pardo rojizos, desiguales, elípticos u oblongos, glabros; corola con cinco pétalos amarillos, desiguales, el mayor de 7 mm de largo, oblanceolados, obtusos, glabros.

Tiene diez estambres amarillos de 7 mm de largo, ovario súpero, unilocular con varios óvulos. El fruto es una vaina aplanada de 3 a 6 cm de largo y de 6 a 15 mm de ancho, pardo amarillenta, membranosa, dehiscente, conteniendo de una a dos semillas.

La madera es dura y pesada con un peso específico de 0.95 a 1.00 g/cm<sup>3</sup>. La albura es de color blanquecino y el duramen naranja, volviéndose rojo oscuro con la exposición al aire, Tiene textura media a fina y grano de recto a irregular. Es muy resistente y durable y, toma un buen pulido. Se utiliza para postes, ebanistería, leña y carbón. Del duramen se extrae el colorante hematoxilina, de gran uso en histología, para la tinción de tejidos y en la fabricación de tintas y tinturas. También la madera tiene propiedades medicinales. Es plantada en cercas vivas y como ornamentales. Es una planta melífera.





Figura 2. *Haematoxylon campechianum*. Rama e inflorescencia.

Fuente: <https://assessment.ifas.ufl.edu/assessments/haematoxylum-campechianum/>

- DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

Se distribuye naturalmente desde México, a través de América Central y en las Antillas. Se ha introducido por medio del cultivo en algunos países como: Filipinas, Colombia y Venezuela. Forma parte de las selvas altas perennifolias o medianas subperennifolias y subcaducifolias, que se desarrollan entre 0 y 1500 msnm, con precipitaciones anuales de 1000 a 3000 mm y una temperatura promedio de 20°C. Generalmente se desarrolla sobre suelos planos, profundos y arcillosos que suelen inundarse en la época de lluvias. Crece bien en suelos calizos. Forma rodales casi puros llamados “tintales”, o se encuentra con otras especies como: *Metopium brownei* (Jacq.) Urban, *Cameraria latifolia* L., *Eugenia lindeniana* Berg., *Talisia floresii* Standley, *Bucida buceras* L., *Coccoloba cozumelensis* Hems., *Croton reflexifolius* H. B. K, e *Hyperbaena winzerlengii* Standley.

- FLORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN

La especie florece de septiembre a abril en México y de diciembre a mayo en Puerto Rico.

Los frutos maduros permanecen en el árbol por varios meses. La semilla tiene forma oblonga o vagamente elíptica, comprimida de 8 a 10 mm de largo. La testa es de color moreno amarillento, lisa, opaca o lustrosa, coriácea, de 0.2 a 0.3 mm de grosor; el embrión es ligeramente curvo, de color amarillo crema y ocupa toda la cavidad de la semilla. Tiene dos cotiledones, planos, carnosos, vagamente elíptico; la radícula es corta, inferir y dirigida al hilo. Carece de endospermo.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial, hacen que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad. Debido a esto actualmente se buscan agentes antimicrobianos naturales, las plantas se posicionan en un lugar favorable ya que se les atribuyen compuestos con actividad antimicrobiana. México posee especies cuyas propiedades medicinales no han sido estudiadas por este motivo se seleccionó a *H. campechianum* la cual es utilizada en infusiones, cocciones y ungüentos en comunidades del estado de Tabasco para tratar enfermedades de posible origen infeccioso.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El extracto de *H. campechianum* tendrá efecto antimicrobiano?

## HIPÓTESIS

*H. campechianum* es utilizado para tratar enfermedades de posible origen infeccioso como malestares estomacales, enfermedades de la piel entonces es probable que presente metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de *H. campechianum*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener extractos de *H. campechianum* de diferente polaridad y determinar su rendimiento.
- Determinar la actividad antimicrobiana cualitativa de los diferentes extractos de *H. campechianum* en cepas de importancia clínica.

- Obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM), concentración fungicida mínima (CFM) y la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) de los extractos que presenten actividad.
- Determinar el efecto sobre la curva de crecimiento de una bacteria Gram positiva, una Gram negativa y una levadura del extracto que presente la mejor actividad.
- Identificar cualitativamente los principales grupos de MS en los diferentes extractos que presenten actividad de *H. campechianum*.

## MATERIALES Y MÉTODO

- COLECTA DEL MATERIAL

La colecta del tronco se realizó en Villahermosa, Tabasco, México en el municipio de Teapa el 10 de enero de 2017 por el Dr. Hugo Virgilio Perales Vela.

- DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

La determinación taxonómica de la planta se realizó en el herbario IZTA de la FES Iztacala, UNAM por la M. en C. Ma. Edith López Villafranco. Se depositó un ejemplar en el herbario, donde se le asignó un número de registro.

- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Los extractos se obtuvieron por el método de maceración, que consiste en la obtención del extracto con solventes orgánicos de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol) a partir del material vegetal. Se colocaron 155.5 gramos del tronco seco y pulverizado en un matraz al cual se le añadió el disolvente. Se dejó reposar durante 48 horas, se filtró el macerado y se evaporó el exceso de solvente a presión reducida. La extracción se realizó cuántas veces fuera necesario para obtener el máximo rendimiento. Finalmente, se permitió que el solvente se evaporará totalmente. El extracto se peso y con ello se determinó el rendimiento del extracto por diferencia de peso con la siguiente fórmula (Domínguez, 1973).

$$\text{Rendimiento} = \text{gramos de extracto obtenido} / \text{gramos de planta seca} \times 100\%$$

- IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE MS

En la detección de los grupos de MS sólo se trabajó con los extractos acetónico y metanólico ya que el rendimiento en el extracto hexánico fue bajo y no se contó con lo suficiente para realizar esta prueba. Para alcaloides se utilizaron los reactivos Drangendorff y Mayer (Wagner, 2001), mientras que para fenoles se realizó con una solución de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 1%. Los monoterpenos se detectaron por la prueba de Vainilla-HCl. En el caso de glicósidos se utilizó la prueba de Molisch y por último para saponinas se realizó la prueba de la espuma la cual debe permanecer al menos un minuto (Dey y Harborne, 1989).

- OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas se obtuvieron de los laboratorios de Farmacognosia de la UBIPRO de la FES Iztacala<sup>1</sup>, de la FES Cuautitlán<sup>2</sup>, el cepario del CINVESTAV-IPN<sup>3</sup> y el laboratorio de análisis clínico de la CUSI<sup>4</sup>:

### **Bacterias**

- Gram positivas

*Staphylococcus aureus* 23 MR<sup>1</sup>; *S. aureus* ATCC 29213<sup>1</sup>; *S. aureus* cc; *S. aureus*<sup>2</sup>; *S. epidermidis* ATCC 12228<sup>3</sup>; *S. epidermidis*<sup>2</sup>; *Enterococcus faecalis* ATCC 14506<sup>3</sup>; *Micrococcus luteus* ATCC 10240<sup>3</sup>.

- Gram negativas

*Vibrio cholerae* ATCC 39540<sup>3</sup>; *Escherichia coli* 82 MR<sup>1</sup>; *E. coli* <sup>4</sup>; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048<sup>3</sup>; *E. gergoviae* ATCC 33028<sup>3</sup>; *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724<sup>3</sup>; *K. pneumoniae* ATCC 13883<sup>3</sup>; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>3</sup>; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* ATCC 7251<sup>3</sup>; *S. typhi*; *Serratia marcescens* ATCC 14756<sup>3</sup>.

### **Levaduras**

*Candida albicans* 17MR<sup>1</sup>; *C. glabrata* cc<sup>1</sup>; *C. tropicalis* cc<sup>1</sup>. cc: caso clínico

- ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

### **Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana**

Para la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Koneman, 2008), como medio de cultivo se utilizó, agar Mueller-Hinton (MH) (Anexo I). Se impregnaron sensidiscos con 2 mg de extracto, usando como control positivo 25 µg de cloranfenicol y como control negativo 10 µL de cada uno de los solventes empleados para la obtención de los extractos. Cada bioensayo se realizó por triplicado y los resultados se reportaron en milímetros.

### **Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana**

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos se realizó por la técnica de microdilución en caldo (Koneman, 2008) (Anexo II). Las concentraciones del extracto a evaluar, fueron: 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 y 0.03 mg/mL. Cada bioensayo se realizó por triplicado, utilizando como revelador biológico cloruro de tetrazolio (TTC). Se consideró resultado positivo cuando al aplicar TTC no se presentó coloración rojiza.

### **Efecto del extracto sobre la curva de sobrevivencia**

La evaluación de la sobrevivencia microbiana se realizó en las cepas que presentaron mayor sensibilidad (Gram positiva, Gram negativa y levadura), para lo cual se revisó su diversidad poblacional en nueve tiempos durante 24 horas al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto ( $\frac{1}{2}$  CMI, CMI, CBM y CFM) y un grupo testigo (sin extracto) (Avila, 1996). Reportándose los resultados como el logaritmo base diez de la unidades formadoras de colonias sobre mL ( $\text{Log } 10^8 \text{ UFC/mL}$ ) (Anexo III).

- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

### **Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antifúngica para levaduras**

Para la evaluación de la actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes se utilizó el método de difusión en agar de Kirby-Baüer, este fue descrito anteriormente al cual se le realizó una modificación que es el uso de agar papa dextrosa (PDA) y como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de nistatina.

La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos sobre hongos levaduriformes se determinaron utilizando la técnica de dilución en agar (Koneman, 2008).

## RESULTADOS

- **Colecta y determinación de la planta**

La determinación del ejemplar estuvo a cargo de la M. en C. Ma. Edith López Villafranco responsable del Herbario IZTA. La planta fue colectada el 10 de enero de 2017 por el Dr. Hugo Virgilio Perales Vela esta se identificó con el nombre de *Haematoxylon campechianum* L. El ejemplar se integró en la colección etnobotánica del herbario IZTA con el número de registro 2596 IZTA, como se observa en el cuadro 1.

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de *H. campechianum*.

Nombre común	Palo de Campeche, tinto.
Nombre científico	<b><i>Haematoxylon campechianum</i> L.</b>
Zona de colecta	Villahermosa, Tabasco
Fecha de colecta	10 de enero de 2017
Uso	Medicinal
Forma de uso	Infusiones y ungüentos
Colector	Hugo Virgilio Perales Vela
No. colecta	2596 IZTA

---

---

- **Obtención de los extractos**

Los rendimientos de los extractos de *H. campechianum* se presentan en el cuadro 2. En este se puede observar el resultado de los tres extractos (metanólico, acetónico y hexánico), obtenidos a partir de 155.5 gramos de planta seca. El extracto que presentó el mayor rendimiento fue el metanólico con 20.48% seguido del acetónico con 4.12% y por último el hexánico con 0.57%, lo que nos sugiere la posible presencia de MS que se extraen con solventes de alta polaridad.

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos obtenidos de *H. campechianum*.

EXTRACTO	% DE RENDIMIENTO
Metanol	20.48
Acetona	4.12
Hexano	0.57

- **Identificación de los principales grupos de MS**

Los extractos se analizaron mediante las pruebas cualitativas de presencia y ausencia de alcaloides, fenoles, glicósidos, terpenos, saponinas y flavonas.

En el cuadro 3 se puede observar que tanto en el extracto metanólico como el acetónico de *H. campechianum* se determinó la presencia de fenoles, terpenos y flavonas.

Cuadro 3. Principales grupos de MS extracto metanólico y acetónico de *H. campechianum*.  
\*Presencia (+), Ausencia(-).

MS	Extracto metanólico	Extracto acetónico
Alcaloides	-	-
Fenoles	+	+
Glicósidos	-	-
Terpenos	+	+
Saponinas	-	-
Flavonas	+	+

- **Actividad antimicrobiana cualitativa**

La evaluación de la actividad antimicrobiana cualitativa se llevó a cabo en bacterias Gram positivas (9 cepas), bacterias Gram negativas (14 cepas) y levaduras (3 cepas). La actividad antibacteriana de los extractos de *H. campechianum* se presentó sólo en los extractos metanólico y acetónico, para el hexánico no se registró actividad sobre los microorganismos evaluados.

Los extractos de *H. campechianum* no mostraron actividad sobre ninguna de las cepas levaduriformes.

El extracto metanólico con los mayores halos de inhibición fue en *M. luteus* ATCC 10240 (24.3 ± 0.5 mm), *S. epidermidis* ATCC 12228 (24.3 ± 0.5 mm) y *S. aureus* CUSI (22.6 ± 0.5 mm).

El extracto acetónico de *H. campechianum* provocó halos de inhibición de 24.3 ± 0.5 mm en *S. epidermidis* ATCC 12228, seguido de *M. luteus* ATCC 10240 (23.3 ± 1.1 mm) y *S. aureus* cc con 22.3 ± 0.5 mm.



Cabe mencionar, que en este bioensayo el registro de los halos de inhibición de los controles (cloranfenicol) fue más pequeños que lo registrado con los extractos, específicamente en las cepas de *E. faecalis* ATCC 14506 ( $18 \pm 0$  mm), *S. aureus* 23MR ( $18.6 \pm 0.5$  mm), *S. aureus* ATCC 29213 ( $22 \pm 1$  mm), *S. aureus* cc ( $22.3 \pm 0.5$  mm), *S. aureus* ( $22.6 \pm 0.5$  mm) , *S. epidermidis* ATCC 12228 ( $24.3 \pm 1.5$ ) y *S. epidermidis* FES ( $18.3 \pm 1.5$ ) (7 cepas) (Figura 3).

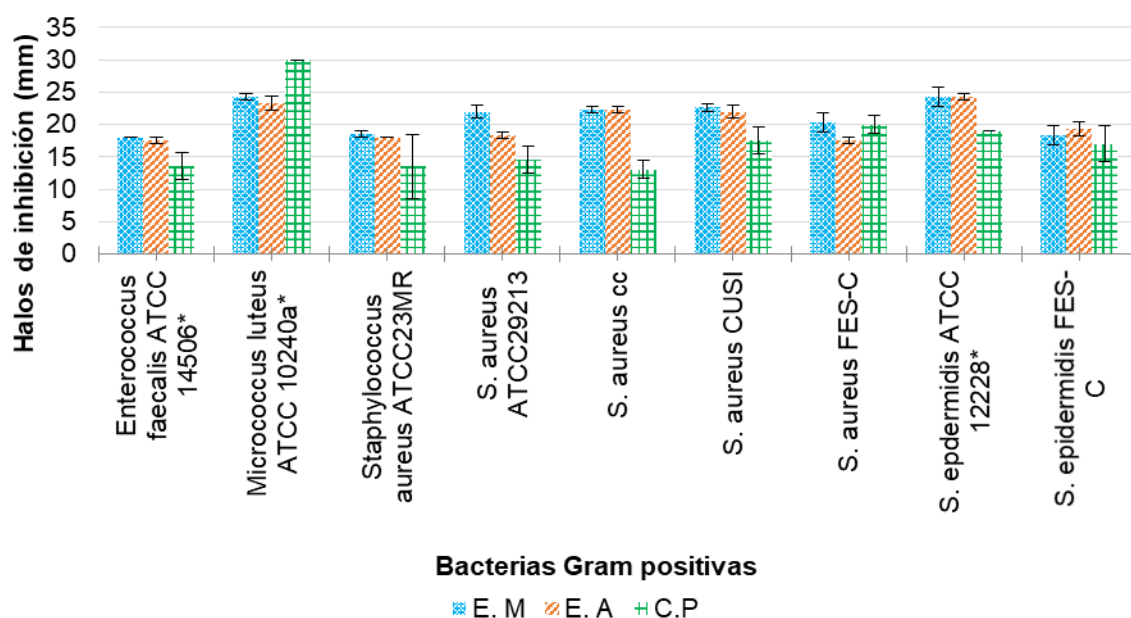


Figura 3. Actividad antibacteriana de los extractos metanólico y acetónico de *H. campechianum* en bacterias Gram positivas. \*Halos de inhibición (mm) valor promedio de tres repeticiones. \*E. M: extracto metanólico. \*E. A: extracto acetónico. \*C. P: control positivo (25 µg cloranfenicol). \*MR:multirresistente.

Con respecto a la actividad antibacteriana en cepas Gram negativas se observó que los extractos metanólico y acetónico mostraron actividad sobre 13 de la 14 cepas evaluadas como se observa en la Figura 4.

El extracto metabólico que presentó los mayores halos de inhibición fueron *V. cholerae* ATCC 39540 ( $17.3 \pm 0.5$  mm), *Y. enterocolitica* ( $15.0 \pm 1.0$  mm), *K. pneumoniae* ATCC 13883 ( $14.6 \pm 0.5$  mm), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* ATCC 7251 ( $13.0 \pm 1.7$  mm) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $13.0 \pm 1.7$  mm).

El extracto acetónico presenta el mayor halo de inhibición en la cepa *V. cholerae* ATCC 39540 ( $16.6 \pm 0.5$  mm) seguido de *K. pneumoniae* ATCC 13883 ( $15.6 \pm 0.5$  mm), *Y. enterocolitica* ( $13.0 \pm 2.0$  mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853 ( $12.3 \pm 1.1$  mm) y *S. enterica*

*subsp. enterica serovar Typhi* ATCC 7251 (10.6 ± 1.5 mm) (Figura 4).

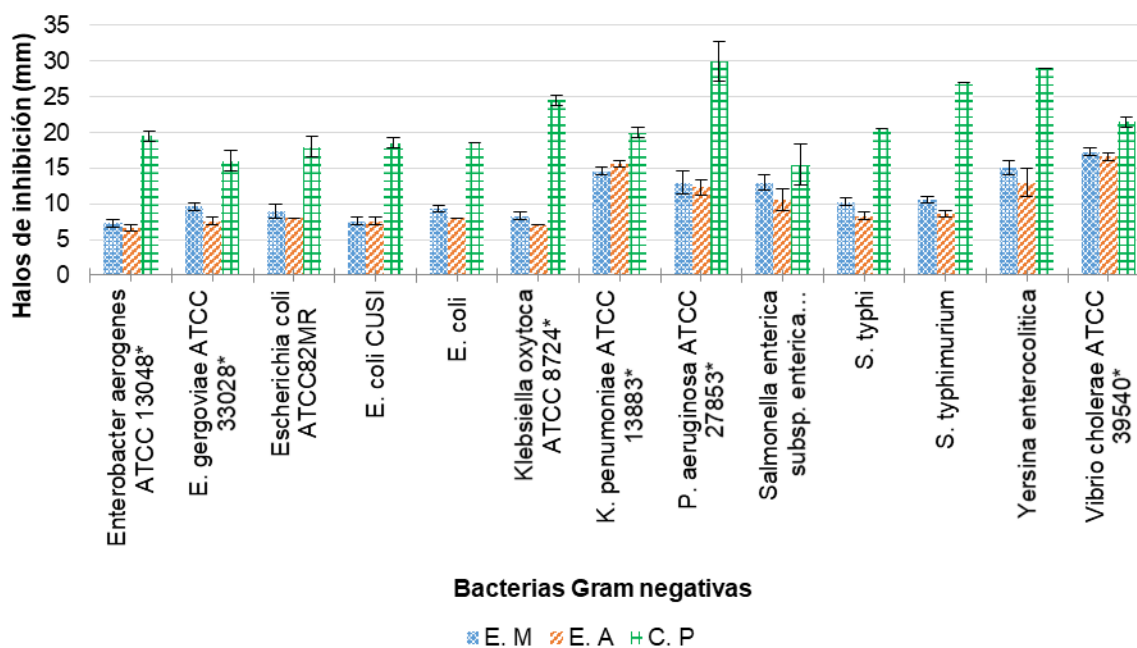


Figura 4. Actividad antibacteriana de los extractos metanólico y acetónico *H. campechianum* en bacterias Gram negativas. \*Halos de inhibición (mm) valor promedio de tres repeticiones. \*E. M: extracto metanólico. \*E. A: extracto acetónico. \*C. P: control positivo (25 µg cloranfenicol). \*MR: multirresistente.

- **Actividad antimicrobiana cuantitativa**

La actividad antimicrobiana cuantitativa sólo se determinó con cepas bacterianas debido a que no se registró actividad en levaduras en el ensayo cualitativo (Kirby-Baüer).

Los resultados obtenidos en la determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de *H. campechianum* se muestra en el cuadro 4. Como se puede observar las cepas Gram positivas que presentan mayor sensibilidad fueron *S. aureus* cc y *S. aureus* CUSI (CMI=0.125 mg/mL), siendo las mismas cepas bacterianas las que tienen la menor CBM con 0.25 mg/mL. Las cepas restantes (6 cepas) obtuvieron una CMI de 0.25 mg/mL y una CBM de 0.5 mg/mL.

Cuadro 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos metanólicos de *H. campechianum* sobre cepas Gram positivas.\*Concentraciones expresadas en mg/mL.

<b>CEPAS GRAM POSITIVAS</b>	<b>CMI mg/mL</b>	<b>CBM mg/mL</b>
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	0.25	0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 23MR	0.25	0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.25	0.5
<i>S. aureus</i> cc	0.125	0.25
<i>S. aureus</i> CUSI	0.125	0.25
<i>S. aureus</i> FES-C	0.25	0.5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.25	0.5
<i>S. epidermidis</i> FES-C	0.25	0.5

Por otra parte los resultados obtenidos en la determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de *H. campechianum* en bacterias Gram negativas se muestra en el cuadro 5.

Como se puede observar la cepa que presentó mayor sensibilidad fue *V. cholerae* ATCC 39540 (CMI=0.5 mg/mL y CBM=0.75 mg/mL) en comparación con las 12 cepas bacterianas restantes.

Cuadro 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos metanólicos de *H. campechianum* sobre cepas Gram negativas. \*NA: no presentó actividad. \*Concentraciones expresadas en mg/mL.

<b>CEPAS GRAM NEGATIVAS</b>	<b>CMI mg/mL</b>	<b>CBM mg/mL</b>
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.75	1.0
<i>E. gergoviae</i> ATCC 33028	0.75	1.0
<i>E. coli</i> ATCC 82MR	1.0	1.5
<i>E. coli</i> CUSI	1.0	1.5
<i>E. coli</i>	1.5	2.0
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	0.75	1.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	0.75	1.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.75	1.0
<i>S. enterica subsp. enterica serovar Typhi</i> ATCC 7251	0.75	1.0
<i>S. typhi</i>	1.5	2.0
<i>S. typhimurium</i>	1.5	2.0
<i>Y. enterocolitica</i>	0.75	1.0
<i>V. cholerae</i> ATCC 39540	0.5	0.75

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de los extractos acetónicos de *H. campechianum* se muestran en el cuadro 6. Como se puede observar las cepas Gram positivas que presentaron mayor sensibilidad fueron *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* FES-C (CMI=0.06 y 0.03 mg/mL), siendo las mismas cepas bacterianas las que tienen la

menor CBM con 0.125 y 0.06 mg/mL. Las cepas restantes (6 cepas) obtuvieron una CMI de 0.125 a 0.25 mg/mL y una CBM de 0.25 a 0.5 mg/mL.

Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos acetónicos de *H. campechianum* sobre cepas Gram positivas. \*Concentraciones expresadas en mg/mL.

<b>CEPAS GRAM POSITIVAS</b>	<b>CMI</b> mg/mL	<b>CBM</b> mg/mL
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	0.25	0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 23MR	0.125	0.25
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.06	0.125
<i>S. aureus</i> cc	0.25	0.5
<i>S. aureus</i> CUSI	0.125	0.25
<i>S. aureus</i> FES-C	0.03	0.06
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.125	0.25
<i>S. epidermidis</i> FES-C	0.25	0.5

En el cuadro 7 se muestran los resultados de la determinación cuantitativa de las bacterias Gram negativas de los extractos acetónicos de *H. campechianum*.

La cepa *E. gergoviae* ATCC 33028 (CMI=0.25 mg/mL y CBM=0.5 mg/mL) fue la que presentó la mayor sensibilidad al extracto acetónico por debajo de las 12 cepas restantes.

Cuadro 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos acetónicos de *H. campechianum* sobre cepas Gram negativas. \*Concentraciones registradas en mg/mL. - Concentración fuera de rango.

<b>CEPAS GRAM NEGATIVAS</b>	<b>CMI mg/mL</b>	<b>CBM mg/mL</b>
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	>3	>>3
<i>E. gergoviae</i> ATCC 33028	0.25	0.5
<i>E. coli</i> ATCC 82MR	1.5	2.0
<i>E. coli</i> CUSI	3	>3
<i>E. coli</i>	0.75	1.0
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	0.75	1.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1.0	1.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.75	1.0
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> ATCC 7251	1.5	2.0
<i>S. typhi</i>	1.5	2.0
<i>S. typhimurium</i>	1.5	2.0
<i>Y. enterocolitica</i>	0.5	0.75
<i>V. cholerae</i> ATCC 39540	0.25	0.5

- **Curvas de crecimiento bacteriano**

Fueron las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y *E. gergoviae* ATCC 33028 las que se seleccionaron ya que presentaron mayor sensibilidad al extracto acetónico. En la figura 5 se puede observar el efecto del extracto acetónico de *H. campechianum* sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 (Gram positiva), en ella se muestra que el grupo testigo presentó un crecimiento exponencial con 4.1 a 8.0 Log UFC/mL después de 24 horas. La ½ CMI se mantiene en 4.3 Log UFC/mL transcurridas las primeras tres horas, después de esto el comportamiento es exponencial, estabilizándose en 7.9 Log UFC/mL después de 24 horas. Con lo que respecta a la CMI permanece constante durante cuatro horas con valores de 4.3 a 5.3 UFC/mL, transcurrido este tiempo la población bacteriana va en aumento y se mantiene en 8.1 Log UFC/mL a las 24 horas.

Por otro lado la CBM presentó una constante (4.1- 4.5 Log UFC/mL) durante las seis primeras horas, posteriormente el descenso es a 3.7 Log UFC/mL a las 7 horas. Por lo que se sugiere que el extracto acetónico de *H. campechianum* presenta actividad bacteriostática sobre *S. aureus* ATCC 29213.

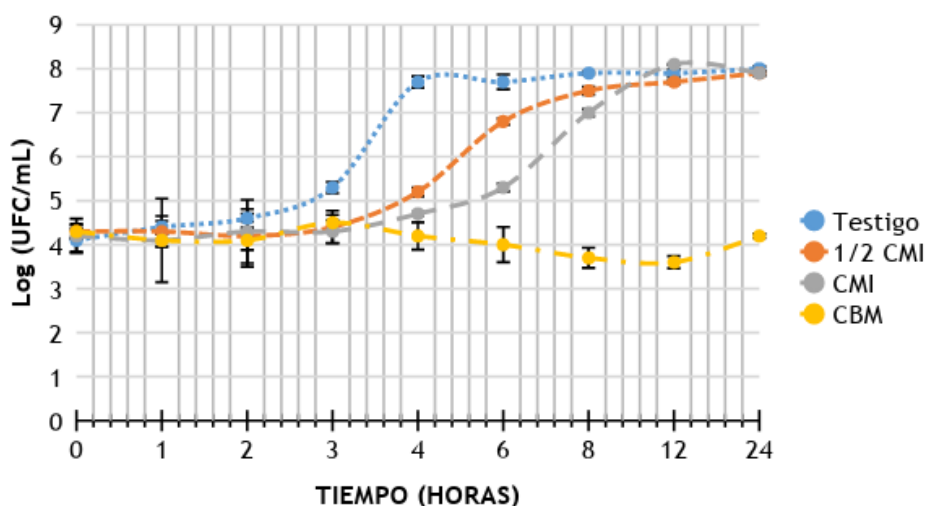


Figura 5. Curva de mortalidad del extracto acetónico de *H. campechianum* sobre la cepa *S. aureus* ATCC 29213 durante 24 horas. \*Concentraciones: Testigo= sin extracto , ½ CMI= 0.03 mg/mL, CMI= 0.06 mg/mL y CBM= 0.125 mg/mL.

Con lo que respecta al crecimiento de la cepa *E. gergoviae* ATCC 33028 (Gram negativa) el efecto que presentó ante el extracto acetónico se muestra en la figura 6. Aquí se observa

que el testigo tuvo un crecimiento exponencial de 4.2 a 7.9 Log UFC/mL transcurridas 24 horas. El comportamiento de la población bacteriana expuesta a la ½ CMI permaneció constante durante las cuatro primeras horas, después se presentó un crecimiento exponencial de 7.5 Log UFC/mL, manteniéndose así después de 24 horas. La CMI durante las seis primeras horas presentó valores de 4.3 a 4.8 Log UFC/mL, llegando a 7.8 Log UFC/mL transcurridas 24 horas. Finalmente la CBM durante las primeras seis horas obtuvo valores de 4.2 a 4.6 Log UFC/mL, llegando a 7.7 Log UFC/mL transcurridas las 24 horas. Lo que muestra que el extracto acetónico de *H. campechianum* también tiene actividad bacteriostática sobre *E. gergoviae* ATCC 33028.

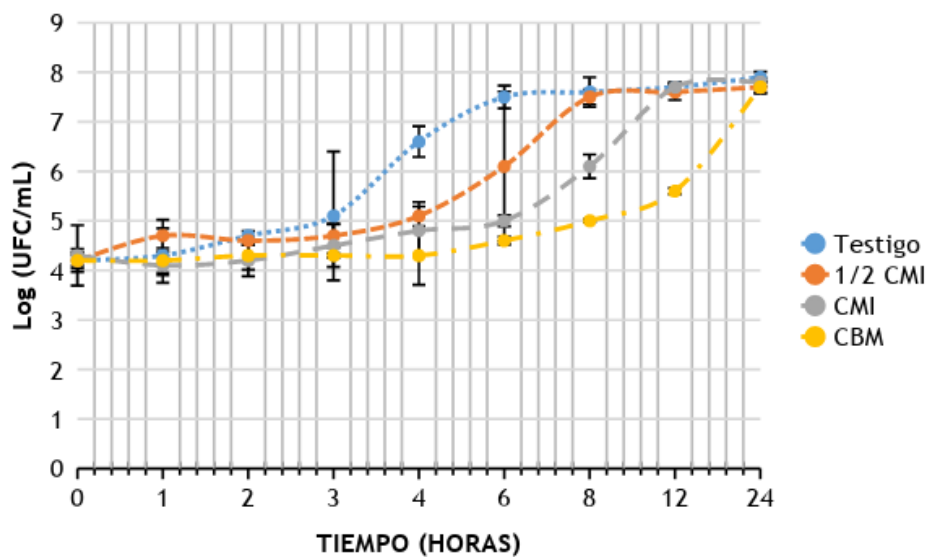


Figura 6. Curva de mortalidad del extracto acetónico de *H. campechianum* sobre la cepa *E. gergoviae* ATCC 33028 durante 24 horas. \*Concentraciones: Testigo= sin extracto, ½ CMI= 0.25 mg/mL, CMI= 0.5 mg/mL y CBM= 0.75 mg/mL.

## DISCUSIÓN

- **Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios y rendimiento.**

El mayor rendimiento obtenido fue para el extracto metanólico (20.48%) comparado con el extracto hexánico (0.57%). Los resultados obtenidos para los rendimientos de los extractos de *H. campechianum* sugieren que la mayor parte de los componentes de la planta son de naturaleza polar, ya que las cortezas están constituidas principalmente de ligninas y lignanos (Preston, 1974). Estos contienen grupos funcionales OH, azúcares y anillos aromáticos, los cuales les dan la característica de ser polares (Croteau *et al.*, 2002).



La composición de los extractos está sujeta a variables tales como: técnicas de extracción, tratamiento o almacenamiento del material y condiciones geobotánicas de crecimiento, tales diferencias pueden deberse a la época en la que la planta fue colectada, la parte que se utilizó para el extracto, la etapa de crecimiento o las condiciones en las que estaba desarrollándose (Ruiz *et al.*, 2007).

De los extractos evaluados y que presentaron actividad (metanólico y acetónico) se lograron identificar tres principales grupos de MS los cuales fueron, fenoles, terpenos y flavonas (cuadro 2). El-Sayed y colaboradores (1994 y 1996) reportan en *H. campechianum* compuestos pertenecientes a estos grupos tales como: ácido gálico, ácido elágico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, galatos de metilo y etilo y dos nuevos compuestos que son: 2,6-bis-O-digaloil-3-O-galoilglucosa y 2-O-trigaloil-1,3,6,6-tetraquis-O-galoilglucosa.

- **Evaluación de la actividad antimicrobiana cualitativa**

En cuanto a la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana el extracto metanólico presentó actividad tanto en bacteria Gram positivas como Gram negativas (23 cepas). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sánchez-Marroquín y colaboradores (1958) quienes obtuvieron respuesta positiva de los extractos metanólicos (alta polaridad) obtenidos de la madera de *H. brasiletto* frente a *S. typhosa* y *S. aureus*.

Los extractos de *H. campechianum* no presentaron actividad en cepas levaduriformes en esta investigación. Por otra parte Rivero-Cruz en 2008 reporta la actividad de *H. brasiletto* en una levadura (*C. albicans*) atribuyendo esta actividad a tres compuestos: hematoxilina, brazilina y ácido gálico.

Zarco-Espinosa en 2010 demostró que los extractos de la corteza de *H. brasiletto* presentaban actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos entre los que destacan *S. mutans*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella sp.*, de hecho este autor reportó una CMI menor a 1000 µg/mL. En el presente estudio cabe resaltar que tanto el extracto metanólico como el extracto acetónico de *H. campechianum*

tuvieron actividad en las últimas cuatro especies mencionadas anteriormente con CMI de 0.75 mg/mL lo cual concuerda con lo reportado por el autor antes mencionado.

De las 23 cepas evaluadas en este estudio 9 fueron Gram positivas y 14 Gram negativas, el que la actividad se presente en ambos tipos bacterianos, indica que el extracto no está actuando a nivel de pared celular, sino que está afectando otra vía metabólica por ejemplo: síntesis de proteínas, síntesis de ADN o ARN (Schlegel, 1997). Esto probablemente se deba a que algunos compuestos de los extractos puedan presentar sinergismo en dicha actividad, debido a que el extracto es una mezcla de compuestos y pudiesen atravesar distintas envolturas celulares afectando la membrana celular alterando de manera inespecífica algunos transportadores celulares y en algunos casos estos mecanismos han de activarse por enzimas intracelulares, antes de alcanzar su blanco de acción y matar a la bacteria (Baquero *et al.*, 2002). En consecuencia, si solo estaría actuando a nivel de pared celular solo se tendría actividad en un solo tipo bacteriano (Sikkema *et al.*, 1994; Sikkema *et al.* 1995).

- **Evaluación de la actividad antimicrobiana cuantitativa**

En la evaluación cuantitativa se observó que las cepas más sensibles al extracto metanólico de *H. campechianum* fueron: *E. aerogenes*, *E. gergoviae*, *K. oxytoca*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* y *Y. enterocolitica* con una CMI de 700 µg/mL. Esto no concuerda con Rivero-Cruz en 2008 quien reporta la actividad inhibitoria del extracto metanólico de *H. brasiletto* sobre *S. aureus*, *E. faecium*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. mutans* y *P. gingivalis* con una CMI de 128 µg/mL. Ya que la síntesis de metabolitos secundarios en plantas está regulada por diferentes factores genéticos y evolutivos, así como las condiciones de crecimiento (clima, fotoperiodo, temperatura y luz), y las variaciones fisiológicas (Asgari *et al.*, 2017).

Por otro lado, García y colaboradores (2005) registraron una CBM de 0.3 - 0.4 mg/mL del extracto etanólico de *H. brasiletto* sobre *V. cholerae*. En comparación con el extracto metanólico de *H. campechianum* que registró una CBM igual a 0.75 mg/mL para *V. cholerae* ATCC 39540 y el extracto acetónico registró una CBM de 0.5 mg/mL., estos valores son semejantes a lo reportado por García y cols 2005.

Es importante mencionar que no se presentan diferencias en la actividad cualitativa entre

las bacterias Gram positivas y Gram negativas, sin embargo al determinar la CMI y la CBM, se observa que las Gram positivas resultaron más sensibles, esto se pueda deber a la diferencia en la composición de la pared celular. La resistencia de las bacterias Gram negativas podría deberse a la alta complejidad de la membrana externa de este grupo de microorganismos (Ultee, 1999). Ya que la membrana externa de las Gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antimicrobianos sin relación química. Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular atraviesan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de membrana (Hancock, 1984). En cambio las bacterias Gram positivas solo por tener una gruesa capa de peptidoglicano, seguida de una membrana interna, permiten con mayor facilidad la penetración de sustancias al interior de la bacteria, ocasionando pérdida de la estabilidad o alteración en alguna vía metabólica según el mecanismo de acción de los compuestos activos (Peña, 2009).

- **Evaluación de las curvas de crecimiento bacteriano**

Las curvas de crecimiento bacteriano muestran que el extracto acetónico de *H. campechianum* presentó efecto bacteriostático sobre las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y *E. gergoviae* ATCC 33028. El efecto bacteriostático del extracto acetónico de *H. campechianum* sobre estas dos especies bacterianas es de gran interés dada su importancia médica.

El género *Staphylococcus* es una bacteria Gram positiva que está presente de forma natural en el ser humano junto a otras especies, formando la microbiota de la piel y mucosas de los humanos. La mayoría de las especies de *Staphylococcus* son capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de sal y se desarrollan en un amplio intervalo de temperaturas (10 a 45°C) y pH (4.2 a 9.3). De las especies de *Staphylococcus* existentes, sólo tres de ellas son las de mayor importancia clínica: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* (Morales, 2013).

*S. aureus* es la más importantes del género y uno de los principales patógenos que infectan al ser humano. Es oportunista y es una causa común de infecciones hospitalarias y comunitarias, que afecta principalmente a grupos de población susceptibles como niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. Aproximadamente entre un 30 y 50% de la población en general es portadora de esta bacteria, lo cual es considerado un riesgo debido

a que puede diseminarse con cierta facilidad y posteriormente desarrollar alguna enfermedad infecciosa (Morales, 2013).

Por otra parte la familia Enterobacteriaceae a donde pertenece *E. gergoviae*, es un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas, reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (Puerta-García *et al.*, 2010). Estos microorganismos se han vuelto cada vez más importante debido a que han estado implicados en infecciones de tejido que rodean material protésico, lo que pueden conducir a infecciones sistémicas, endocarditis, entre otras enfermedades, especialmente en poblaciones de pacientes inmunodeprimidos (Miltiadous y Elisaf, 2011; Wilson, 2008; Smith *et al.*, 1999; Karchmer *et al.*, 1983).

Por último, es importante mencionar que realizar este tipo de investigaciones es de suma importancia, ya que el conocimiento que tiene la gente en ciertas partes del país sobre sus plantas medicinales, pasa de ser un conocimiento empírico a uno científico. Es el caso de la infusión de la corteza del “palo de campeche” (*H. campechianum*) que la comunidad del municipio de Teapa en Villahermosa, Tabasco utiliza para tratar y aliviar malestares estomacales (Chablé-Vega *et al.*, 2019). Tomando en cuenta los resultados de este estudio, donde se comprobaron dichas propiedades biológicas, ya que como se menciona en los resultados, los extractos presentaron actividad sobre bacterias (*S. aureus* y *E. gergoviae*) asociadas a enfermedades del tracto digestivo.

El hecho de que se comprueben efectos antibacterianos de las plantas medicinales permite desarrollar líneas de investigación y la búsqueda de nuevos principios activos, lo cual es de utilidad para el problema de la resistencia bacteriana, ya que actualmente el uso inadecuado de antibióticos por la población ha incrementado (OMS, 2017; Garza-Ramos *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

- *H. campechianum* tiene actividad antibacteriana.
- En el extracto metanólico y acetónico de *H. campechianum* se identificaron la presencia de fenoles, terpenos y flavonas.
- Los extractos metanólico y acetónicos de *H. campechianum* tienen actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y Gram negativas.
- El extracto hexánico no presentó actividad en bacterias y levaduras.
- Las cepas más sensibles registradas para el extracto metanólico fue *S. aureus* (CMI=0.125 mg/mL) y *V. cholerae* (CMI=0.5 mg/mL).
- *S. aureus* (CMI=0.06 mg/mL) y *E. gergoviae* (CMI=0.25 mg/mL) fueron la cepas más sensibles para el extracto acetónico.
- El extracto acetónico de *H. campechianum* presenta actividad bacteriostática sobre *S. aureus* ATCC 29213 (CBM de 0.125 mg/mL) y en *E. gergoviae* ATCC 33028 (CBM de 0.5 mg/mL).
- Este estudio contribuye al conocimiento etnobotánico de *H. campechianum* para la población del municipio de Teapa Villahermosa, Tabasco.

## LITERATURA CITADA

- Argueta-Villamar, A., Caro, L. M., Rodarte, M. E. (Eds.), 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. Tomo I 968-29-6601-9.
- Asgari, L., Ghorbanpour, M. y Nikabad, S. 2017. Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145: 377-390.
- Avila, J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM. México. 234 p.
- Baquero, F., Blazquez, J. y Martinez, J. 2002. Mutacion y resistencia a los antibioticos . *Invetsigacion y ciencia*. Diciembre; 72-78.
- Chablé-Vega, M., Plasencia-Vazquez, A., Garcia-Gonzalez, A., Ferrer-Sanchez Y., Riverón-Giró F. y Zamora-Crescencio P. 2019. Distribucion, densidad y estructura dasometrica de *Haematoxylum campechianum* y *Haematoxylum calakmulense* en Campeche, Mexico. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 6 (16): 65-77.
- Cortez G. V., Macedo J. P., Kernandez A. M. Arteaga A-. Espinoza G. D., Rodríguez L. J. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*, 15: 123-126.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. 2002. Natural products (secondary metabolites). En: Buchnan. B., Gruissem, W., Jones, R. Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of plants Physiology. USA. 1250-1318 pp.
- Dey, P. M. y Harbone, J. B. 1989. *Methods in Plant Biochemistry*. Volumen 1. Academic Press Limited. 552 pp.
- Domínguez, X. A. 1973. *Metodos de investigación fitoquímica*. Ed. Limusa. México. 281 p.
- El-Sayed, N. H., Michael, H. N., Kandil, F. E., Ishak, M. S y Mabry, T. J. 1994. Flavonoids and other phenolics of *Haematoxylon campechianum*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 22, 7: 763-764.
- Kandil, F. E., El-Sayed, N. H., Michael, H. N., Ishak, M. S y Mabry, T. J. 1996. Gallotannins and Flavonoids from *Haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry*. 42, 4:1243-1245.
- García, S., Alarcón, G., Gómez, M. y Herendi, N. 2005. *Haematoxylon brasiletto* Extracts Inhibit Growth, Enterotoxin Production and Adhesion of *Vibrio cholerae*. *Journal of Food Protection*. 19, 2: 15-26.
- Garza-Ramos, U., Peña-Miller, R. y Collado, J. (2017). Resistencia Microbiana. <http://www.cciencias.mx/es/fichas/item/511-resistencia-microbiana.html> consultada en Marzo de 2018.
- Geilfus, F. 1989. El árbol al servicio del agricultor. Manual de agroforestería para el desarrollo rural. Guía de especies. Santo Domingo. República Dominicana Enda-Caribe: CATIF. 778 p.
- Hancock, R. E. 1984. Alterations in membrane permeability. *Revista de*

Microbiología. 38: 237-264.

- Heredia, N., García, S., Alarcón, G. y Gómez, M. 2005. *Haematoxylon brasiletto* Extracts inhibit growth, enterotoxin production, and adhesion of *Vibrio cholerae*. Food Biotechnology. 19: 15-26.
- Hernández, P., R. Ballina B., R. y Hernández, B., S. (2016). Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Tabasco, México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM27tabasco/municipios/27016a.html>, consultada en Febrero de 2018.
- Kakuko Y., Fumiko A., Ariaki N., Hikaru O., Lozada P., López V., Estrada M., Aguilar A., Reyes Chilpa. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. Journal of Ethnopharmacology. 97, 2:293-9.
- Karchmer, A. W.; Archer, G. L. y Dismukes W. E. 1983. *Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. Annals of Internal Medicine. 98, 4: 447-455.
- Koneman, E. W. 2008. Pruebas de sensibilidad a agentes microbianos. En: Winn, W. C. Diagnóstico Microbiológico. México: Medica Panamericana. 902-974 pp.
- Martínez-Luna. 2001. Compuestos antimicrobianos aislados de las especies *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth. (Asteraceae) y *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae). Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México. 98 p.
- Masuda, H., Ohtani, K., Mizutani, K., Ogawa, S., Kasai, R. y Tanaka, O. 1991. Chemical study on *Haematoxylon campechianum*: a sweet principle and new Dibenz [b, d] oxocin Derivatives. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 39, 6: 1382-1384.
- Miltiadous, G. y Elisaf, M. 2011. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. Journal of Medical Case Reports. 5: 251.
- Morales, C. E., Jiménez, R. L. V., Rodríguez, C. A. A., Vega, M.M E. y Espinosa, M. L.E. 2013. Caracterización de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina aislado de pacientes con piodermatitis. Dermatología Revista Mexicana. 57, 3: 165-170.
- Niembro R., A. 1983. Caracterización morfológica y anatómica de semillas forestales. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Estado de México. 212 p.
- Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversitas. 62: 12-15.
- Organización Mundial de la Salud. 2010. <http://www.who.int/es/>, consultada en Febrero de 2017.
- Organización Mundial de la Salud. 2017. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>, consultada en Febrero de 2018.
- Peña, G. C. I. 2009. Actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de la corteza de *Senna skinneri* Bentham, Irwin y Barneby (PARACA). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 48 p.
- Preston, R. D. 1974. The physical biology of plant cell walls. Chapman and Hall Ltd. 491 p.
- Puerta-García, A y Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. Medicine. 10, 51:

3426-3431

- Rivero-Cruz, J. F. 2008. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. Journal of Ethnopharmacology. 119: 99-103.
- Ruiz, C., Stashenko, E., E., Tunarosa, F. y Martínez, M., J. 2007. Estudio comparativo por gc-ms de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* obtenidos por diferentes tecnicas de extraccion. Scientia et Technica. 1, 33: 325-328.
- Sánchez-Marroquin, A., García, L., Mendez, M., 1958. Brazilin, antibacterial substance from *Haematoxylon brasiletto*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 1, 225–232.
- Schlegel, H. 1997. Microbiología general (nueva edición). Ediciones Omega. 365 p.
- Sepúlveda-Jimenez. G. Porta, D. H. y Rocha, S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21, 3: 355-363.
- Sikkema, J., De Bont, J. y Poolman, B. 1994. Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membranes. The Journal of Biological Chemistry 269 (11): 8022-8028.
- Sikkema, J., De Bont, J. y Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews 59(2): 201-222.
- Smith, K. J., Neafie, R., Yeager, J. y Skelton, H. G. 1999. *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. British Journal of Dermatology. 141: 558-561.
- Timyan, J. 1996. BWA YO. Important Trees of Haiti. Washington. D. C. EE. UU. 418 p.
- UFIFAS. Assessment of Non-Native Plants in Florida's Natural Areas. <https://assessment.ifas.ufl.edu/assessments/haematoxylum-campechianum/> consultada en Febrero 2018.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., Smid, E.J. 1999. Mechanism of actions of carvacrol on the food-borne pathongen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 4606-4610.
- Wagner, H. 2001. Plant drug analysis. Second Edition. Springer Alemania. 15-29 pp.
- Waterman, P. G. Roles of Secondary Metabolites in Plants. Secondary Metabolites: Their Function and Evolution. Ciba Foundation Symposium. 1992. 171, 255. Eds. Chadwick. D. J.; Whelan, J. John Wiley y Sons, USA.
- Zarco-Espinosa. G. L. 2010. Compuestos con actividad sobre *Streptococcus mutans*, aislados de la infusión de *Haematoxylon brasiletto* Karst. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. 53 p.



## ANEXOS

### **I. Difusión en Agar o Kirby-Baüer (Koneman, 2008).**

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos vegetales, se utiliza agar Mueller-Hinton ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas.

El inóculo se prepara tocando las superficies convexas de 4 a 5 colonias con un asa de siembra, se sumerge en 10 mL de caldo, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa. El tubo con la bacteria se incuba a 37 °C durante 24 horas o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar de 0.5 en la escala de MacFarland.

Posteriormente a 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 el agar que previamente se dejó solidificar. Finalmente se siembra mediante estría en tres direcciones dando vueltas a la plana en ángulos aproximados de 60° luego de cada estría. Se utilizan sensidiscos de 5 mm.

### **II. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) (Koneman, 2008).**

La cuantificación de la actividad antimicrobiana de manera *in vitro* se evalúa con frecuencia mediante alguna variante de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio del cultivo (caldo o agar). Tras la incubación de los organismos, se realiza una comparación del crecimiento de los microorganismo mediante la turbidez que presenten o en su defecto por variantes de la misma técnica (Cantón *et al.*, 2000). La CMI es la concentración mínima del antibiótico que inhibe el crecimiento, mientras que la CBM es la concentración a la cual se considera que las bacterias se encuentren muertas (Struthers y Westran, 2005).

#### **Microdilución en caldo**

Para esta técnica se necesita preparar un cultivo bacteriano tomando de 4 a 5 colonias bacterianas con un asa de siembra estéril y colocándolas en un tubo con 10 mL de caldo MH previamente esterilizado. Incubar el tubo a 37 °C por 24 horas alcanzando una

concentración final de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL o una turbidez de 0.5 en la escala de MacFarland, de este inóculo se toma 0.1 mL y se diluye en 99.9 mL de solución salina al 0.9%.

Cada placa de Elisa es preparada con 50  $\mu$ L de caldo MH con las concentraciones de extracto a probar más 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana preparada anteriormente. Se lleva a incubar a 37 °C por 24 horas concluida la incubación se añade 50  $\mu$ L de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08%, se incuba por 30 minutos a una temperatura de 37 °C, formándose una pastilla de color rojizo donde el microorganismo se encuentre vivo o incolora donde el microorganismo se encuentre muerto.

### **III. Curva de mortalidad (curva de supervivencia o efecto sobre el crecimiento) (Kubo *et al.*, 1993).**

Para esta técnica primero se deben preparar un inóculo inicial de  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL (una incubación aproximada de 12 a 18 horas a 37 °C), en un tubo de 10 mL de caldo MH, además de cuatro tubos con caldo MH para las concentraciones de  $\frac{1}{2}$  CMI, CMI, CBM y el grupo testigo, también se preparan tubos con solución salina al 0.08% para las posteriores diluciones.

En el tiempo cero se preparan los tubos con las concentraciones correspondientes de  $\frac{1}{2}$  CMI, CMI, CBM y testigo, agregándoles 0.1 mL del inóculo bacteriano preparado con anterioridad. Se siembra 50  $\mu$ L directamente en el agar MH de los tubos problemas en la dilución cero y se toma una alícuota de 50  $\mu$ L de los tubos preparados para diluirlo en un tubo de 5 mL de solución salina y se siembra en la dilución uno, se realiza el mismo procedimiento para la dilución dos. Este procedimiento se realiza cada dos horas durante ocho horas, pasadas las ocho horas se realiza cada seis por un periodo de 24 horas. Los resultados se grafican en Log 10 de las colonias supervivientes contra el tiempo de exposición del extracto.