



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
Euphorbia nutans Lag.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS ZAMBRANO ROSAS

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES

Los Reyes Iztacala, Estado de México
Julio 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

Esta tesis estuvo bajo la dirección de la Dra. Ana María García Bores, los experimentos fueron realizados en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), perteneciente a la División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, y en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de Ciudad Universitaria, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto:

DGAPA PAPIIT IN215017

“Farmacognosia de plantas selectas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de padecimientos cutáneos”

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS	III
II. ÍNDICE DE TABLAS	IV
III. ABREVIATURAS	V
IV. RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
Taxa y descripción botánica de la familia Euphorbiaceae	2
Taxonomía de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.	4
Descripción botánica de <i>E. nutans</i>	4
Antecedentes	5
Usos de la familia Euphorbiaceae	5
Usos de <i>E. nutans</i>	6
Estudios fitoquímicos del género <i>Euphorbia</i>	6
Propiedades antimicrobianas de especies del género <i>Euphorbia</i>	8
Justificación	10
Pregunta científica	10
Hipótesis	10
Objetivo general	10
2. MATERIALES Y MÉTODO	11
Descripción de zona de estudio	12
Colecta del material vegetal	13
Análisis fitoquímico de los extractos con diferente polaridad de <i>E. nutans</i>	13
Obtención de extractos y rendimiento	13
Perfil fitoquímico con pruebas colorimétricas	13
Pruebas antimicrobianas	14
Actividad antibacteriana	14
Actividad antifúngica	16
Análisis de variación temporal de los metabolitos secundarios en los extractos de <i>E. nutans</i>	16
Cromatografía en placa fina de alto rendimiento (HPTLC) de los extractos de <i>E. nutans</i>	16

Análisis estadístico	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Material vegetal	18
Rendimiento de los extractos	18
Perfil fitoquímico	19
Actividad antibacteriana	20
Evaluación cualitativa	20
Evaluación cuantitativa: Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)	21
Actividad antifúngica	23
Análisis de variación temporal de los extractos activos de <i>E. nutans</i> por HPTLC	23
Perfil de terpenos	23
Variación temporal de terpenos en <i>E. nutans</i>	27
Perfil de flavonoides glicosilados	30
Variación temporal de flavonoides glicosilados en <i>E. nutans</i>	32
Perfil de agliconas	33
Variación temporal de agliconas en <i>E. nutans</i>	36
4. CONCLUSIONES	38
5. BIBLIOGRAFÍA	39
CRÉDITOS DE FOTOGRAFÍAS	43

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Algunas características de la familia Euphorbiaceae.	3
Figura 2. <i>Euphorbia nutans</i> .	5
Figura 3. Estrategia metodológica.	11
Figura 4. Cálculo de CMI y CMB por dilución en placa.	15
Figura 5. Ejemplar herborizado de <i>E. nutans</i> .	18
Figura 6. Número de sobrevivientes de <i>S. aureus</i> expuestas a seis extractos de <i>E. nutans</i> .	22
Figura 7. Inhibición del crecimiento radial de extractos de <i>E. nutans</i> sobre <i>T. mentagrophytes</i> .	23
Figura 8. HPTLC de los extractos hexánicos y acetónicos de <i>E. nutans</i> .	24
Figura 9. Cromatograma de perfil de terpenos de los extractos hexánicos y acetónicos de <i>E. nutans</i> .	25
Figura 10. Variación de las sustancias terpénicas (ST) de los extractos hexánicos de <i>E. nutans</i> .	28
Figura 11. Variación de las sustancias terpénicas (ST) de los extractos acetónicos de <i>E. nutans</i> .	29
Figura 12. HPTLC de los extractos acetónicos de <i>E. nutans</i> para separar flavonoides glicosilados (FG).	30
Figura 13. Cromatograma de perfil de flavonoides glicosilados de los extractos acetónicos de <i>E. nutans</i> .	31
Figura 14. Variación de los flavonoides glicosilados en los extractos acetónicos de <i>E. nutans</i> .	33
Figura 15. HPTLC de los extractos acetónicos de <i>E. nutans</i> para separar flavonoides de tipo aglicona (FA).	34
Figura 16. Cromatograma de perfil de agliconas de los extractos acetónicos de <i>E. nutans</i> .	35
Figura 17. Variación de agliconas (FA) en los extractos acetónicos de <i>E. nutans</i> .	36

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes de los compuestos aislados y estudiados en especies del género <i>Euphorbia</i> .	7
Tabla 2. Antecedentes de la actividad antimicrobiana de especies del género <i>Euphorbia</i> .	8
Tabla 3. Rendimiento de seis extractos de las partes aéreas de <i>E. nutans</i> con diferentes solventes.	18
Tabla 4. Pruebas cualitativas para metabolitos secundarios en diferentes extractos de <i>E. nutans</i> .	20
Tabla 5. Actividad antibacteriana de seis extractos de <i>E. nutans</i> .	21
Tabla 6. Efecto antimicrobiano de seis extractos de <i>E. nutans</i> para la determinación de CBM.	22
Tabla 7. Sustancias encontradas en el HPTLC de los extractos H1 y H2, para el perfil de terpenos.	26
Tabla 8. Sustancias encontradas en el HPTLC de los extractos A1 y A2 para perfil de terpenos.	27
Tabla 9. Flavonoides glicosilados (FG) encontrados en el HPTLC de los extractos A1 y A2 de <i>E. nutans</i> .	32
Tabla 10. Agliconas (FA) encontradas en el HPTLC de los extractos A1 y A2 de <i>E. nutans</i> .	35

III. ABREVIATURAS

A1	Extracto acetónico de <i>E. nutans</i> , planta colectada en el mes de septiembre de 2017
A2	Extracto acetónico de <i>E. nutans</i> , planta colectada en el mes de octubre de 2017
Ac	Acetona
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DCM	Diclorometano
EtOH	Etanol
FA	Flavonoide tipo aglicona de <i>E. nutans</i>
FG	Flavonoide glicosilado de <i>E. nutans</i>
H1	Extracto hexánico de <i>E. nutans</i> , planta colectada en el mes de septiembre de 2017
H2	Extracto hexánico de <i>E. nutans</i> , planta colectada en el mes de octubre de 2017
HPTLC	Cromatografía en placa fina de alto rendimiento, por sus siglas en inglés (High Performance Thin Layer Chromatography)
Hx	Hexano
M1	Extracto metanólico de <i>E. nutans</i> , planta colectada en el mes de septiembre de 2017
M2	Extracto metanólico de <i>E. nutans</i> , planta colectada en el mes de octubre de 2017
ST	Sustancia terpénica de <i>E. nutans</i> .

IV. RESUMEN

En la piel las infecciones bacterianas y fúngicas constituyen un grupo de enfermedades que el hombre se ha enfocado en tratar con plantas, cuyos principios activos son potencialmente tóxicos para los microorganismos. Euphorbiaceae es una de las familias más diversas entre las Angiospermas usada en la medicina tradicional. El género *Euphorbia* ha sido empleado por sus compuestos activos en tratamientos tópicos para la piel. Una especie de este género poco estudiada es *E. nutans*, los reportes sobre esta planta hasta ahora han sido únicamente descriptivos. Por lo que el objetivo de este proyecto fue conocer la actividad antimicrobiana de *E. nutans* sobre cepas microbianas de importancia clínica. *E. nutans* fue colectada durante el mes de septiembre y octubre del 2017 en Tonatico, Estado de México. Se obtuvieron seis extractos (H1, H2, A1, A2, M1 y M2) a partir de las partes aéreas de la planta, mediante el método de maceración y con tres solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol). Se hicieron pruebas colorimétricas para caracterizar parcialmente el perfil fitoquímico de los extractos y éstos fueron evaluados en cuanto a su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y el hongo *Trichophyton mentagrophytes*. Con el fin de comparar los perfiles de metabolitos secundarios y la variación temporal de los extractos de *E. nutans*, los extractos se analizaron por cromatografía de placa fina de alto rendimiento (HPTLC). Los resultados de este estudio indican que el perfil fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de la planta contiene, lactonas sesquiterpénicas, taninos, terpenos, esteroides, saponinas, fenoles y glicósidos. Sólo los extractos H1, H2, A1, M1 y M2 tuvieron actividad antibacteriana a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4 mg/mL y el extracto A2 presentó una concentración mínima bactericida (CMB) de 4 mg/mL y una CMI de 2 mg/mL sobre *S. aureus*. En la caracterización parcial por HPTLC de los extractos acetónicos y hexánicos de *E. nutans* se confirmó la presencia de catorce sustancias terpénicas, seis flavonoides glicosilados y cinco agliconas. Además, contienen amirina y rutósido en los extractos con actividad biológica. Existe una variación temporal en el rendimiento, actividad antibacteriana y producción de metabolitos secundarios de los extractos de *E. nutans*.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas y fúngicas de la piel constituyen un grupo de enfermedades de las capas superficiales de este órgano que evolucionan a una propagación profunda. Cuando se trata de bacterias, el padecimiento puede llegar a ser muy severo en infecciones como el impétigo, la erisipela y la miositis que pueden presentarse también con necrosis como celulitis necrosante y mionecrosis. Las bacterias con mayor prevalencia en estos padecimientos son *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* (Fernández, 2014). Otro microorganismo involucrado es *S. epidermidis* que junto con *S. aureus* han desarrollado resistencia a la meticilina en los últimos 20 años (García et al., 2003). Aunque *S. epidermidis* es una bacteria comensal en la flora epitelial humana, es considerada como un patógeno oportunista en enfermedades nosocomiales (Otto, 2009).

En las infecciones por hongos en la piel, los principales organismos dermatofitos son *Trichophyton tonsurans*, *T. soudanense* y *T. mentagrophytes*, microorganismos filamentosos causantes del pie de atleta y la tiña. Las especies de *Fusarium* (principalmente *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. moniliforme*) son hongos con micelio causantes de infecciones cutáneas locales, incluidas onicomicosis, infecciones de heridas quirúrgicas y úlceras preexistentes, además de infecciones diseminadas (Gupta et al., 2000). En el mismo rubro, también se encuentra el hongo levaduriforme *Candida albicans*, causante de una pustulosis conocida como candidiasis cutánea que afecta a neonatos humanos (Sánchez-Schmidt et al., 2005; Weston et al., 2008).

El hombre se ha enfocado en tratar estos padecimientos con plantas cuyos principios activos son potencialmente tóxicos para otras formas de vida tales como hongos y bacterias. Las familias botánicas que destacan por sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas son: Asteraceae, Asclepiadaceae, Solanaceae y Euphorbiaceae, entre otras (Gil et al., 2006). Esta última, es una de las familias más diversas entre las Angiospermas, en la República Mexicana se encuentran 826 especies dentro de 50 géneros, representando el 10.19% de las especies y el 15.77% de los géneros existentes para la familia Euphorbiaceae (Martínez et al., 2002). El género *Euphorbia* es distinguido por la presencia de látex blanco, que ha sido empleado en tratamientos tópicos para la piel y la purgación del tracto gastrointestinal por sus compuestos activos (Ernst et al., 2015). Así, *Euphorbia hirta* ha sido utilizada en el tratamiento de infecciones respiratorias, como asma, catarro, gripe y bronquitis crónica. También *E. hirta* se emplea para tratar las afecciones oculares, de la piel y mucosas (Lorente, 2003).

Una especie poco estudiada de la familia Euphorbiaceae es *E. nutans*, el conocimiento que se tiene sobre esta especie ha sido meramente descriptivo (Salmaki et al., 2011; Pahlevani y Riina, 2011). Otros autores la mencionan en sus listados florísticos (Sánchez-Blanco y Guevara-Fefer, 2013; Harker et al., 2008), sin embargo, las características del perfil fitoquímico y el análisis farmacognóstico de *E. nutans* aún no han sido reportados. En México, es frecuente el empleo del género *Euphorbia* para tratar heridas, granos y otras nosologías dérmicas, en el caso particular de Tonatico, Estado de México la especie *E. nutans* se utiliza para sanar callos (Aguilar et al., 1994; Leon, 2019 com. pers.).

Uno de los estados de la República Mexicana donde se tiene conocimiento sobre el uso tradicional de la flora vascular y de la familia Euphorbiaceae es el Estado de México, que resulta ser un territorio pluricultural y de alta diversidad ecológica y social (Monroy, 2016). Uno de sus municipios es Tonatico, en donde predomina una vegetación de tipo bosque tropical caducifolio, el cual es una fuente importante de productos vegetales para sus pobladores (Luna, 2014) y donde fueron colectadas las plantas para este estudio.

Esta investigación forma parte del proyecto PAPIIT que lleva por nombre: “Farmacognosia de plantas selectas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de padecimientos cutáneos”, en donde los resultados preliminares darán informe a que varias especies de la Familia Euphorbiaceae son empleadas para tratar afecciones de la piel.

Taxa y descripción botánica de la familia Euphorbiaceae

Las euforbiáceas son hierbas arbustos o árboles frecuentemente con nectarios extraflorales y látex (Figura 1: A, B). Algunas euforbiáceas son tóxicas, tanto para el ser humano como para los animales; otras producen reacciones alérgicas y unas pocas se utilizan en la medicina popular; algunas son forrajeras y otras de importancia industrial [(higuerilla (*Ricinus communis*), árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*)], la yuca (*Manihot esculenta*) es una planta alimenticia de primera magnitud y otras [(nochebuena (*E. pulcherrima*), corona de cristo (*E. splendens*)] tienen valor ornamental (Steibel, 1995). Las flores son estaminadas con corola o más frecuentemente apétalas, con androceo de 1 a 10 estambres y anteras ditécicas de dehiscencia longitudinal. Las inflorescencias son racemosas con flores o en un ciatio (*Euphorbia*) (Figura 1: C), también pueden ser flores solitarias opuestas a las hojas. En la familia las flores son pistiladas con corola o más frecuentemente apétalas, con ovario tricarpelar. Los frutos generalmente se encuentran en una

cápsula tricoca, son dehiscentes, bivalvos y tienen semillas endospermadas (Steibel, 1995) (Figura 1: D).

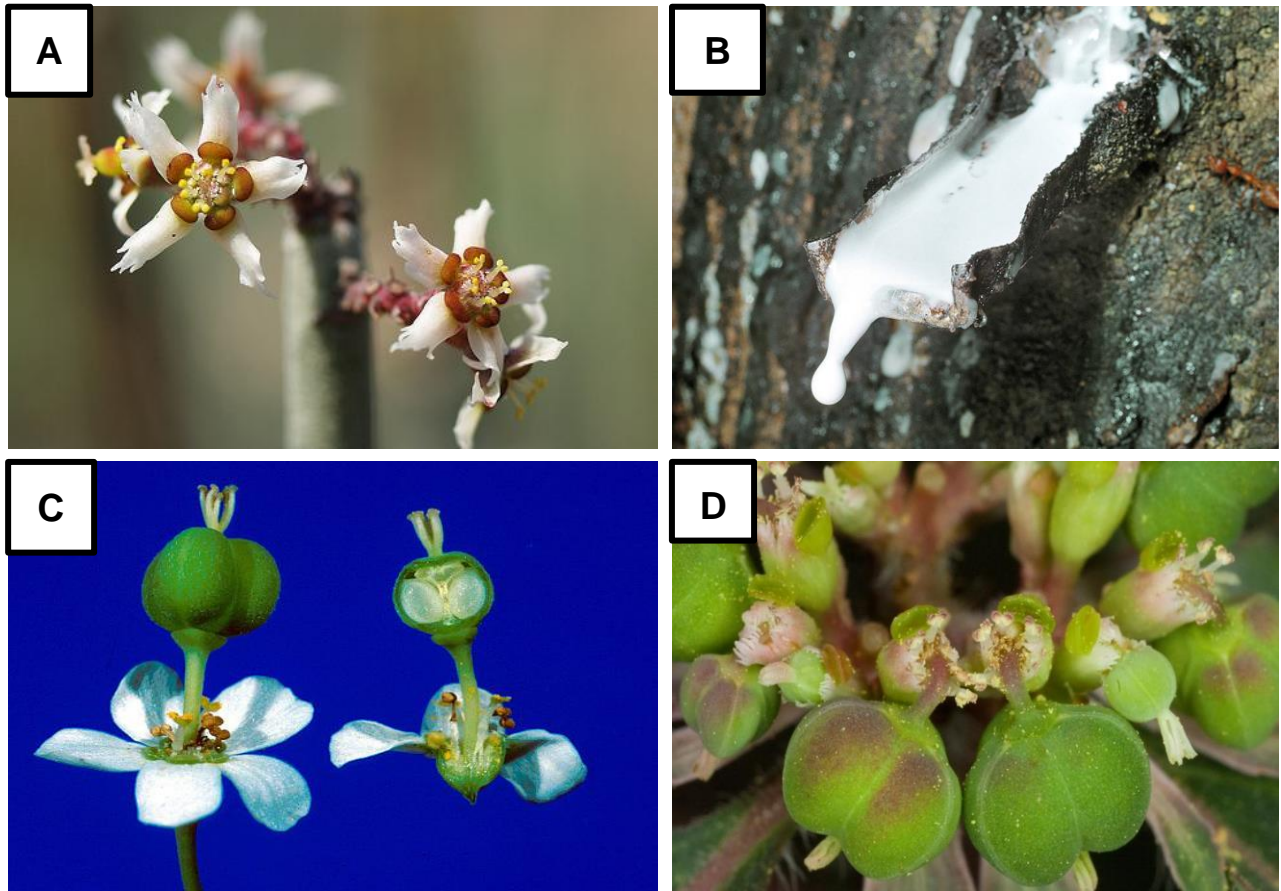


Figura 1. Algunas características de la familia Euphorbiaceae.

A. Flor de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*), se muestran sus nectarios extraflorales de color marrón; **B.** Árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), el látex es que produce este árbol tiene uso industrial; **C.** Ciatio de *Euphorbia corollata* estructura floral con flores masculinas abajo y femeninas arriba; **D.** Fruto de Euphorbiaceae.

CRÉDITOS DE FOTOGRAFÍAS: Pag. 43.

Taxonomía de *Euphorbia nutans* Lag.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Euphorbia*

Subgénero: *Chamaesyce*

Epíteto específico: *Euphorbia nutans* Lag.

Descripción botánica de *E. nutans*

Euphorbia nutans Lag. (*E. preslii* Guss., *Chamaesyce nutans* Lag. Small). Es una planta herbácea, generalmente anual, a veces perenne, por lo común erecta o ascendente, raras veces rastrera, mide de 10 a 50 cm de alto, glabra o con pubescencia dispuesta en líneas longitudinales; el tallo es simple o saliendo varios desde la base, ramificándose más arriba en forma dicótoma; las son hojas opuestas; las estípulas de cada par de hojas opuestas, a veces manchadas con rojo, ápice redondeado o agudo con borde más o menos aserrado (Figura 2); los ciatios son solitarios o dispuestos en cimbras; las semillas son ovoides-cuadrangulares, de 1 a 1.5 mm de largo, cafés o grises oscuras, finas e irregularmente ornamentadas con surcos transversales o celdillas. Esta planta está muy bien distribuida en el Valle de México en alturas desde los 2250 msnm hasta 2850 msnm. Se encuentra en matorrales, pastizales, encinares, con frecuencia a la orilla de veredas y caminos o entre los cultivos. Se distribuye ampliamente en las regiones cálidas del mundo; en América se encuentra de Estados Unidos a Sudamérica (Rzedowski y Rzedowski, 2006).

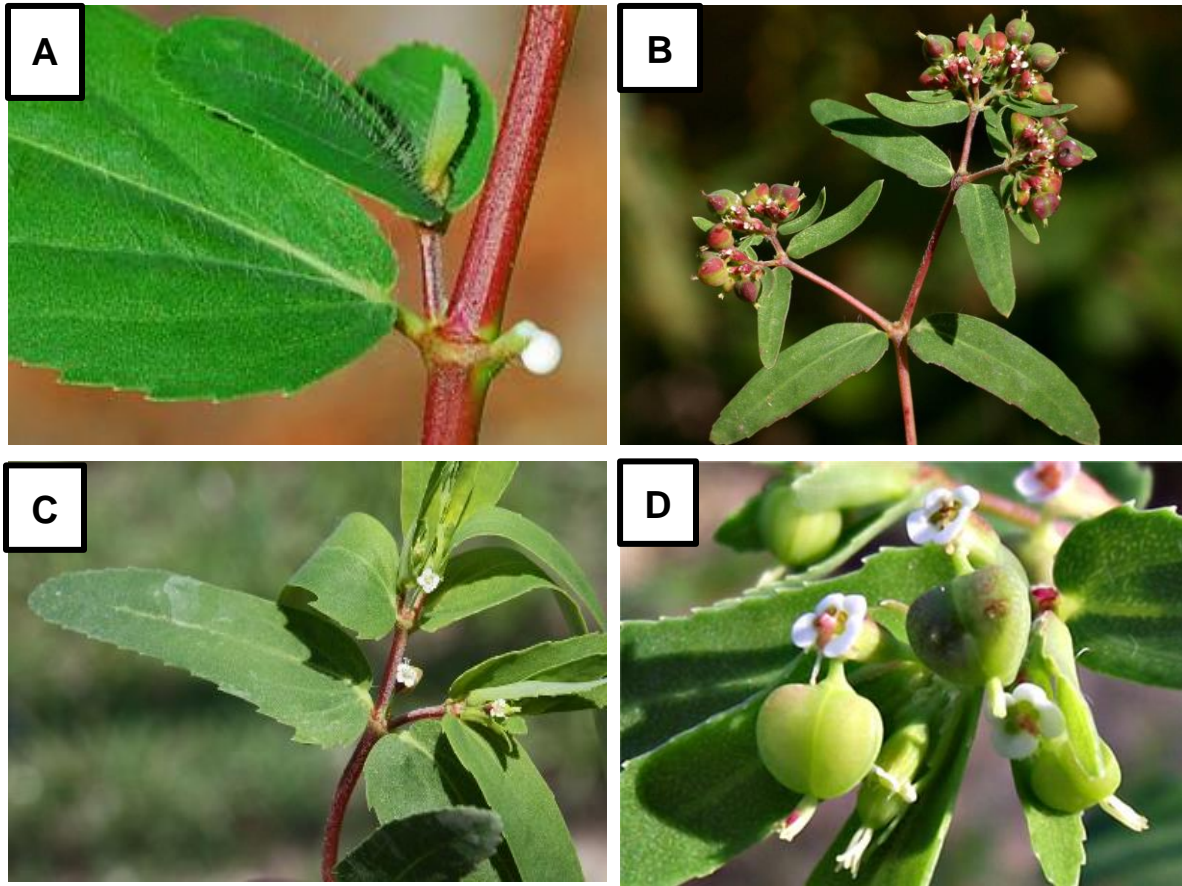


Figura 2. *Euphorbia nutans*.

A. Látex y pubescencia en hojas; **B.** Hábito de la planta; **C.** Hojas aserradas; **D.** Frutos y flores. **CRÉDITOS DE FOTOGRAFÍAS:** Pag. 43.

Antecedentes

Usos de la familia Euphorbiaceae

La etnomedicina de la familia Euphorbiaceae y del género *Euphorbia* nace desde tiempos inmemorables, tal es el caso del médico Euforbo, se cree que de él curaba al rey Juba II de Mauritania con aceite de *E. resinifera* cuando éste sufría de indigestión (Mwine y Van Damme, 2011). Siglos después plantas como *E. polycarpa*, *E. hirta*, y *Acalypha indica* ya eran parte del sistema Ayurveda, un tipo de medicina tradicional hindú (Hooper, 2002). Actualmente, diferentes tribus de países como India mencionan que la flora de esta familia botánica se ha utilizado en el tratamiento de problemas dermatológicos, como: eczemas, tiña, dermatitis atópica, barros, sarna, lepra, aftas, fuegos (Tripathi y Srivastava, 2010). En la antigua herbolaria del sur de China, se

registró el uso medicinal de 33 especies pertenecientes a 17 géneros de Euphorbiaceae (Lai et al., 2004).

Por otra parte, Ankli et al., (1999) reportaron la herbolaria de los sanadores mayas en Yucatán, México, mencionando especies de la familia Euphorbiaceae con diferentes aplicaciones y usos, como, *Euphorbia ptercineura* para asma y tos; *Croton peraeuginosus* para granos y *Phyllanthus micrandrus* para heridas e inflamaciones. Otras euforbiáceas en México son utilizadas principalmente para la cicatrización de heridas, como *Croton draco* y *Jatropha dioica*. Sin embargo *C. draco* también es utilizada para tratar resfriados, gripes y diarreas; mientras que *J. dioica* se utiliza para evitar la caída del cabello y combatir la caspa (Ocegueda et al., 2005).

En la medicina tradicional mexicana distintas especies del género *Euphorbia* son usadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como *E. albomarginata*, *E. hirta*, *E. thymifolia*, *E. glomerifera* y *E. adenoptera* (Rojas et al., 2010). Debido a lo anterior, el género *Euphorbia* tiene diversos usos en la medicina, más del 5% de las especies del género han sido descritas como tratamientos para diferentes padecimientos estomacales, respiratorios, inflamatorios y de la piel, especialmente los miembros del subgénero *Chamaesyce*. Aunque este último taxón ha sido poco investigado en cuanto a su composición química (Ernst et al., 2015).

Usos de *E. nutans*

En México, es frecuente el empleo del género *Euphorbia* para tratar heridas, granos y otras nosologías dérmicas, en el caso particular de Tonatico, Estado de México la especie *E. nutans* se utiliza para sanar callos (Aguilar et al., 1994; Leon, 2019 com. pers.).

El único reporte que se tiene de actividad antimicrobiana de *E. nutans* es el de Escamilla (2019), debido a lo anterior se recurrió a investigar estudios realizados sobre especies del género *Euphorbia* en cuanto a su composición química y sus propiedades biológicas.

Estudios fitoquímicos del género *Euphorbia*

En la Tabla 1 se muestran distintos productos naturales que han sido aislados de diferentes especies del género *Euphorbia*.

Tabla 1. Antecedentes de los compuestos aislados y estudiados en especies del género *Euphorbia*.

Grupo de productos naturales	Compuestos y referencias
Terpenos	<p>Monoterpenos: Mirceno, pineno, β-pineno, sabineno, timol, geraniol, linalool, etc en <i>E. monostyla</i> (Baslas, 1982 en Rizk, 1986).</p> <p>Sesquiterpenos: Aromadendrano, α-bergamopteno, ρ-cimeno en <i>E. peplus</i> (Bittner et al., 2001).</p> <p>Diterpenos: Casbanos en <i>E. bracteolata</i>, jatropanos en <i>E. segetalis</i>, dafnanos en <i>E. semiperfoliata</i>, abietanos en <i>E. fischeriana</i>, etc. (Shi et al., 2008).</p> <p>Triterpenos: α-amirina, β-amirina, betulina, cicloartenol, eufol (α y β), lupeol, taraxasterol, tirucalol en <i>Euphorbia</i> spp. (Rizk, 1986), pepluano en <i>E. peplus</i>, β-sitosterol en <i>E. aleppica</i>, <i>E. segetalis</i>, estigmasterol en <i>E. boetica</i>, campesterol, etc. (Shi et al., 2008).</p> <p>Ácidos grasos: Cerebrósidos en <i>E. nicaeensis</i>, <i>E. sororia</i> (Shi et al., 2008).</p>
Compuestos fenólicos	<p>Flavonas: 7-O glucósido de apigenina en <i>Euphorbia</i> spp. (Rizk, 1986).</p> <p>Flavonoles: Isomiricitrina, miricetina, kaempferol, quercetina, ramnetina en <i>Euphorbia</i> spp., (Rizk, 1986), hiperósido, astragalina, etc. en <i>E. latifolia</i> (Shi et al., 2008).</p> <p>Flavanonas: Stepósido, stepogenina en <i>Euphorbia</i> spp. (Rizk, 1986).</p> <p>Ácidos fenólicos: Ácido elágico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido verátrico en <i>Euphorbia</i> spp. (Rizk, 1986).</p> <p>Cumarinas: Esculetina, euforbetina, isoeuforbetina en <i>Euphorbia</i> spp. (Rizk, 1986)</p>
Compuestos nitrogenados	<p>Uracilo, uridina en <i>E. altotibetic</i> (Shi et al., 2008) Extracto de alcaloides en <i>E. hirta</i> (Singh y Kumar, 2011)</p>

Propiedades antimicrobianas de especies del género *Euphorbia*

Varias especies de *Euphorbia* han sido estudiadas para conocer su potencial antimicrobiano. A continuación, se presentan las especies investigadas y los microorganismos utilizados (Tabla 2).

Tabla 2. Antecedentes de la actividad antimicrobiana de especies del género *Euphorbia*.

Especies	Extracto de las partes utilizadas	Microorganismos	Referencias
<i>E. macroclada</i>	Partes aéreas	HONGOS MICELIADOS: <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Stemphylium solani</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp. y <i>Pythium</i> sp.	Khalil y Mughrabi et al., 2003
<i>E. aleppica</i> <i>E. szovitsii</i> <i>E. falcata</i> <i>E. denticulata</i> <i>E. macroclada</i> <i>E. cheiradenia</i> <i>E. virgata</i> <i>E. petiolata</i>	Ramas con flores y látex	GRAM (-) <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Proteus vulgaris</i> GRAM (+) <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LEVADURAS: <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , HONGOS MICELIADOS: <i>Trichophyton</i> sp., <i>Epidermophyton</i> sp.	Kirbag et al., 2013
<i>E. segetalis</i>	Toda la planta	GRAM (+): <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>S. aureus</i> . LEVADURAS: <i>Candida kruzei</i> , <i>C. glabrata</i>	Madureira et al., 2002

<i>E. nivulia</i>	Hojas	<p>GRAM (+): <i>Arthrobacter citreus</i> <i>Bacillus cereus</i>, <i>B. licheniformis</i>, <i>B. polymyxa</i>, <i>B. pumilus</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>Clostridium</i> sp., <i>S. aureus</i>, <i>Streptococcus</i> sp. <i>Sarcina lutea</i>.</p> <p>GRAM (-): <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella aerogenes</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>P. putida</i> <i>Salmonella typhimurium</i>,</p> <p>LEVADURAS: <i>C. albicans</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	Annapurna et al., 2004
<i>E. amygdaloides</i> <i>E. cyparissias</i> <i>E. helioscopia</i> <i>E. myrsinites</i> y <i>E. palustris</i>	Hojas	<p>GRAM (+): <i>B. subtilis</i>, <i>S. aureus</i>,</p> <p>GRAM (-): <i>E. coli</i></p> <p>LEVADURA: <i>C. albicans</i></p>	Papp, 2004
<i>E. hirta</i>	Hojas	<p>GRAM (-) <i>E. coli</i>, <i>S. typhi</i>, <i>P. aeruginosa</i></p> <p>GRAM (+) <i>S. aureus</i></p>	Ogbulie et al., 2007
<i>E. hirta</i> <i>E. nutans</i> <i>Euphorbia</i> sp.	Partes aéreas	<p>GRAM (+) <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i></p>	Escamilla, 2019

Justificación

Tomando en cuenta el uso de las plantas del género *Euphorbia* a nivel nacional para tratar padecimientos cutáneos y que son escasos los estudios fitoquímicos de *E. nutans*, son necesarios los análisis farmacognósticos que permitan una mejor caracterización de esta planta para conocer sus propiedades medicinales, antibióticas y la variación de metabolitos secundarios en distintos tiempos de colecta.

Pregunta científica

¿Puede *E. nutans* tener actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos patógenos de la piel?

Hipótesis

Sí las especies de la familia Euphorbiaceae y el género *Euphorbia* son reconocidas por tener compuestos activos potencialmente efectivos como tratamiento cutáneo tópico contra microorganismos bacterianos y fúngicos, entonces *E. nutans* puede tener actividad antimicrobiana.

Objetivo general

- Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de *E. nutans* sobre especies microbianas de importancia clínica cutánea.

Objetivos particulares

- Caracterizar los extractos de diferentes polaridades de *E. nutans* en cuanto a su rendimiento y perfil fitoquímico.
- Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad antimicrobiana de los extractos de *E. nutans*.
- Determinar si existe variación temporal entre el perfil fitoquímico y la actividad biológica de *E. nutans*

2. MATERIALES Y MÉTODO

La estrategia metodológica para conocer la actividad antimicrobiana y variación temporal de los metabolitos secundarios de *E. nutans* se dividió en cuatro: la colecta de material vegetal; la obtención y caracterización de extractos; las pruebas antimicrobianas y el análisis de variación temporal (Figura 3).

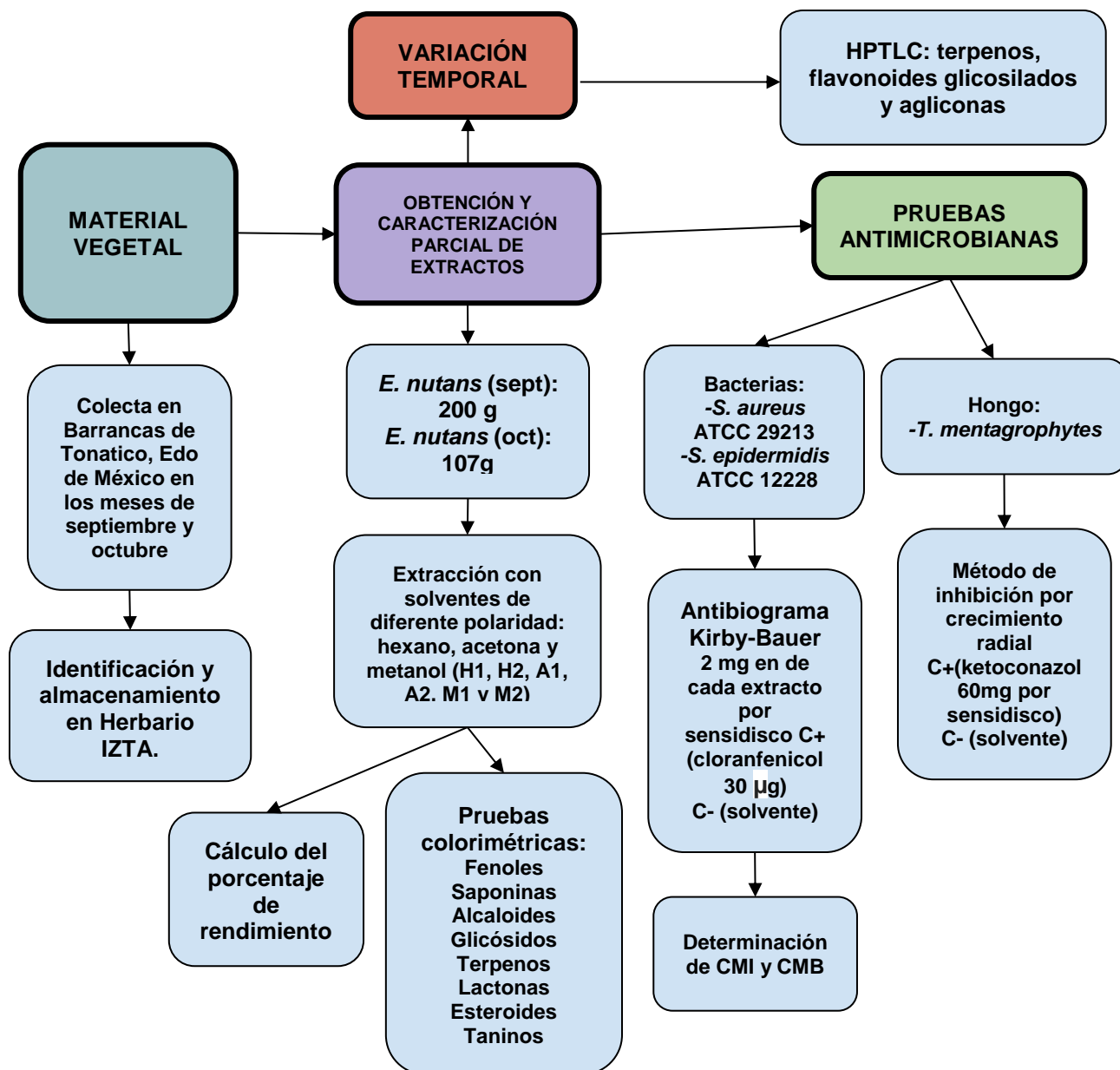


Figura 3. Estrategia metodológica.

Descripción de zona de estudio

El municipio de Tonatico se localiza al suroeste del Estado de México, a 88 km de Toluca, la capital del Estado de México. Limita al noroeste con Ixtapan de la Sal, Edo. de México, al oriente con Zumpahuacán y al sur con Pilcaya, Guerrero (Hernández, 2000). En el sur del municipio existen una serie de cerros y llanos atravesados por barrancas consideradas como una extensión de los declives del volcán Nevado de Toluca, por lo que dichas barrancas son producto de fallas geológicas orientadas de norte a sur. Este sistema topográfico descrito se encuentra dentro del polígono: 18° 42' 21" N y 99° 47' 36.6" W, 18° 47' 45" N y 99° 41' 09" W, 18° 46' 58.44" N y 99° 40' 02.66" W y por último 18° 46' 38.8" N y 99° 40' 37.9" W (INEGI, 2000).

La zona de estudio forma parte de la cuenca del Río Balsas, y se encuentra dentro de las subprovincias fisiográficas de Valles Guerrerenses que a su vez forman parte de Sierra Madre del Sur (SPP, 1981). La mayor parte del territorio municipal de Tonatico se encuentra a los 1650 m.s.n.m. La barranca de Los Amates-Tlapala se encuentra a una altura de 1580 m.s.n.m. con una profundidad de 120 m, una longitud de 3.15 km y está orientada al suroeste. El área de Tonatico-Ixtapan de la Sal tiene un clima de transición de tipo subhúmedo entre cálido y templado (García, 2004). La precipitación anual es de 963.8 mm; la temporada de sequía se presenta entre noviembre y mayo, mientras que la época de lluvias ocurre entre junio y octubre. La temperatura promedio anual que se tiene en la zona es de 20.0 °C (Jáuregui-Ostos y Vidal-Bello, 1981).

Ya que la mayor parte de la cuenca del río Balsas, se encuentra por debajo de los 1800 m.s.n.m, la vegetación que predomina es bosque tropical caducifolio, por lo que se pueden ver dos facetas en la vegetación de la zona estudio. La primera es resultado de la presencia de lluvias, en donde la vegetación presenta un exuberante verdor y la segunda en contraste, es la época de sequía en donde las plantas de tipo herbáceas mueren debido a la escasez de agua y los árboles pierden todo su follaje. Las familias botánicas más destacadas en las Barrancas de Tonatico son Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Euphorbiaceae, ésta última con 7 géneros y 19 especies registradas para la localidad (Luna, 2014).

Colecta del material vegetal

Las partes aéreas de *E. nutans* fueron colectadas en la Barranca de Los Amates-Tlapala, Tonicaco, Estado de México (18° 46' 51.3" N, 99° 40' 20.5" O) durante el mes de septiembre y octubre del año 2017. El material vegetal fue puesto a secar después de la colecta y se limpió de tierra antes de su maceración. Un ejemplar también fue herborizado, identificado y registrado en el Herbario IZTA.

Análisis fitoquímico de los extractos con diferente polaridad de *E. nutans*

Obtención de extractos y rendimiento

Los extractos de las partes aéreas y caulinares de *E. nutans* fueron obtenidos por el método de maceración según Domínguez (1985). Se obtuvieron 200 g (peso seco) de las plantas colectadas en septiembre y 107 g (peso seco) de los ejemplares colectados el mes de octubre. Las plantas secas de ambas colectas fueron maceradas por separado en solventes de diferente polaridad (hexano: Hx, acetona: Ac y metanol: MeOH). El extracto obtenido después de cada maceración fue filtrado y concentrado a presión reducida con un rotavapor para obtener los sólidos totales. Los extractos obtenidos fueron seis: H1, A1, M1: extracto hexánico, acetónico y metanólico respectivamente de *E. nutans* colectada en mes de septiembre; H2, A2 y M2: extractos hexánico, acetónico y metanólico de *E. nutans* recolectada en mes de octubre. El rendimiento de los extractos fue expresado como el cociente del peso total de la planta seca entre el peso del extracto seco por cien.

Perfil fitoquímico con pruebas colorimétricas

Para la detección de los distintos grupos de metabolitos secundarios presentes en *E. nutans*, se realizó un perfil fitoquímico mediante reacciones coloridas en cada uno de los extractos; se utilizó cloruro férrico para la detección de compuestos fenólicos; reactivo de Mayer y Draggendorff para alcaloides; vainillina y ácido sulfúrico para terpenos; prueba de espuma para saponinas; prueba de Molish para flavonoides glicosilados; prueba de Baljet para lactonas sesquiterpénicas; así como grenetina y cloruro férrico para taninos (Jork et al., 1990; Domínguez, 1985).

Pruebas antimicrobianas

Actividad antibacteriana

Bioensayo cualitativo

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *S. epidermidis* ATCC12228. El antibiograma de discos fue realizado por la técnica de Kirby-Baüer (Koneman et al., 1996) del siguiente modo: Se preparó un inóculo de *S. aureus* y otro de *S. epidermidis* en 10 mL de caldo Mueller-Hinton, se dejaron incubando durante 24 hrs a 37 °C, el inóculo fue medido con un espectrofotómetro Coleman ($\lambda = 560\text{nm}$) y tuvo una absorbancia de 0.21, lo que corresponde a 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de acuerdo al método de dilución. A partir de los inóculos se hicieron siembras con hisopos estériles sobre la superficie de placas con agar Mueller-Hinton, una vez esparcido el inóculo en la placa, a la par se prepararon tres sensidiscos de papel (Whatman No. 5) de 5 mm de diámetro estériles, los cuales fueron impregnados con los extractos (H1, H2, A1, A2, M1 y M2) de *E. nutans* (2 mg/disco). Se usó como control negativo sensidiscos impregnados con 10 μL del disolvente sin extracto. El control positivo fueron sensidiscos con cloranfenicol (30 μg /disco). Se hicieron repeticiones por triplicado. Los halos de inhibición se midieron con un vernier y los resultados fueron reportado en milímetros \pm desviación estándar.

Evaluación cuantitativa

Sólo con extractos que fueron activos en la prueba cualitativa se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por el método de dilución en caldo (Koneman et al., 1996) de la siguiente manera:

En una placa de ELISA se agregaron 100 μL de caldo Mueller-Hinton estéril en todos los pozos. En diferentes viales con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril se agregaron 4 mg de los extractos con actividad biológica H1, H2, A1 y A2. Los extractos fueron suspendidos homogéneamente y de estos se hicieron 6 diluciones a través de la placa (4.0, 2.0, 1.0, 0.50, 0.25, 0.12 y 0.06 mg/mL). Posteriormente, se agregaron 50 μL de caldo inoculado con *S. aureus* [10^6UFC/mL] en todos los pozos, a excepción del control de esterilidad del medio. Como control positivo se utilizó Cloranfenicol (25 μg /pozo) y como control negativo DMSO estéril (2 μL /pozo). La placa fue incubada durante 24 hrs a 37° C. Para determinar la muerte celular se usó cloruro de tetrazolio (TTC) (10mg/mL) que al oxidarse por los microorganismos se torna de color rosáceo. La CMI se consideró como la menor concentración del extracto que inhibió visiblemente el desarrollo de cada uno de los microorganismos ensayados (Figura 4). En un par de filas de la placa de ELISA

(filas D y H de la Figura 4) no fue aplicado el TTC ya que posteriormente esos fueron utilizados para determinar el número de organismos presentes en el pozo para lo cual se determinó el número de sobrevivientes por el método de dilución (Eisenstadt, et al., 1994).

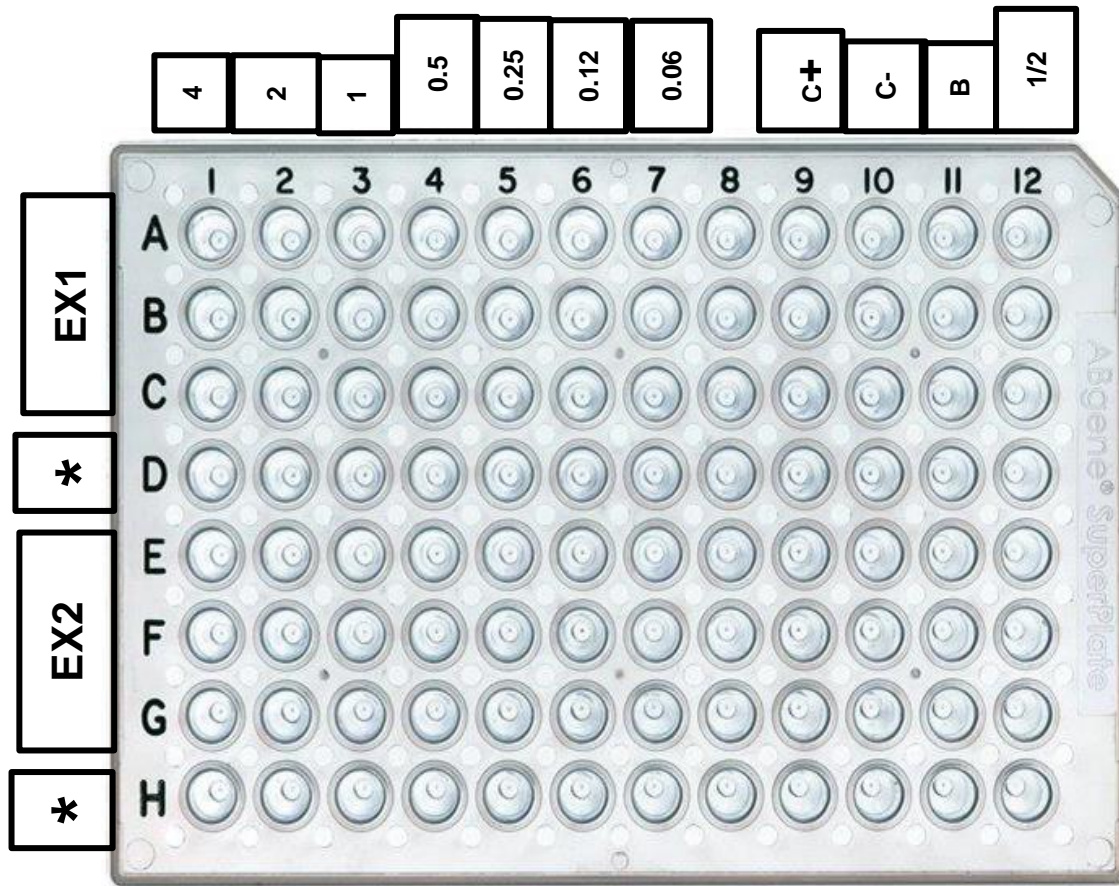


Figura 4. Cálculo de CMI y CMB por dilución en placa.

Hileras 1 (4 mg/mL), 2 (2 mg/mL), 3 (1 mg/mL), 4 (0.50 mg/mL), 5 (0.25 mg/mL), 6 (0.12 mg/mL), 7 (0.06 mg/mL), 8 (separación, pozos vacíos), 9 (C+, control positivo, cloranfenicol 25 µg/pozo), 10 (C-, control negativo, DMSO estéril 2 µL/pozo), 11 (B, control de crecimiento bacteriano), 12 (control de esterilidad); **EX1** (filas A,B,C y D) contenían extractos de *E. nutans* colectada septiembre; **EX2** (filas E, F, H), contenían extractos de la planta colectada en octubre; * Filas D y H no fueron reveladas con TTC.

Actividad antifúngica

Bioensayos cualitativos

Para evaluar la actividad antifúngica de *E. nutans* se realizó el método de inhibición por crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) sobre el hongo filamentoso *T. mentagrophytes*, la cepa fue sembrada en cajas Petri con agar papa-dextrosa (PDA) de la siguiente forma: con la boquilla de una pipeta Pasteur estéril se tomaron trozos de agar de un micelio maduro y con él fueron se inocularon las placas con el agar nuevo. Las cajas inoculadas fueron incubadas por una semana a 25 °C y posteriormente se colocaron sensidiscos de papel Whatman de 5 mm de diámetro impregnados con los seis extractos (2 mg/disco). El control negativo fue el solvente sin extracto (10 µL) y como control positivo se empleó Ketoconazol (30 mg/mL).

Análisis de variación temporal de los metabolitos secundarios en los extractos de *E. nutans*

Cromatografía en placa fina de alto rendimiento (HPTLC) de los extractos de *E. nutans*

Para elucidar la existencia de variación temporal en la composición química de *E. nutans* en los dos tiempos de colectas, los extractos se analizaron por (HPTLC) acoplado a un densitómetro. La cual es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad para el análisis de diversos compuestos de baja masa molecular y que permite obtener las unidades de absorbancia (UA) de cada analito. Se analizó la presencia de terpenos, flavonoides glicosilados y agliconas y se determinó en los extractos previamente elegidos por la actividad biológica (H1, H2, A1 y A2).

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

Los extractos H1 y H2 fueron disueltos en una mezcla de hexano y dicloro metano (Hx:DCM 5:4 v/v) y los extractos acetónicos (A1 y A2) en acetona y etanol (Ac:EtOH 1:1 v/v), ambos extractos en una concentración 1 mg/mL. Con un aparato ATS4 (CAMAG) se aplicaron 10 µL de cada muestra en forma de banda (2 mm) sobre cromatoplasmas de vidrio precubiertas con gel de sílice G-25, con indicador fluorescente UV (254 nm) (Macherey-Nagel). La elución de las cromatoplasmas se hizo la fase móvil adecuada como se describe más adelante Los grupos de metabolitos secundarios se visualizaron en la placa con reveladores específicos después de la elución. A continuación, los cromatogramas fueron analizados mediante densitometría con un Scanner3 (CAMAG) en modo absorción usando distintas longitudes de onda para cada tipo de compuesto, los datos y las sustancias fueron asignados y registrados por el software Wincats v. 4 (CAMAG).

Fases móviles, estándares, reveladores y longitudes de onda empleadas para el HPTLC

- a) **Terpenos.** Cromatografía usada para los extractos H1, H2, A1 y A2; como fase móvil se utilizó Hex:AcOEt:Acetonitrilo ACN (8.2:1.8:0.1, v/v/v), se utilizaron 2 estándares: amirina y ácido ursólico, ambos triterpenos ubicuos en el reino de las plantas. Para revelar se utilizó anisaldehído a manera de rocío y la placa fue escaneada a 560 nm (Wagner y Bladt, 1996).

- b) **Flavonoides glicosilados.** Cromatografía realizada para los extractos A1 y A2; La fase móvil utilizada fue AcOEt:Ac. fórmico:Ac. acético glacial:agua (100:11:11:20, v/v/v/v), como estándares se utilizaron rutina, flavonoide glucósido encontrado en algunas plantas; y quercetina. En la placa cromatográfica se utilizó revelador de productos naturales (RPN) como reactivo y la longitud de onda de escaneo fue 365 nm (Wagner y Bladt, 1996).

- c) **Agliconas.** Cromatografía hecha para los extractos A1 y A2; La fase móvil fue cloroformo CHCl₃:Ac:Ac.fórmico(3.5:1:0.5, v/v/v), como estándares se utilizaron quercetina, una aglicona; y rutina, se utilizó RPN como revelador y la placa fue escaneada a 250 y 365 nm (Wagner y Bladt, 1996).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos por la densitometría fueron utilizados para determinar el porcentaje de similitud y variación temporal entre los metabolitos mediante ANOVA de dos factores (extractos y sustancias; $P < \alpha$), (Nivel de error: $\alpha = 0.05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material vegetal

Un ejemplar de la planta se identificó en el Herbario IZTA donde fue herborizado y resguardado con el número de registro: 2690 IZTA (Figura 5).



Figura 5. Ejemplar herborizado de *E. nutans*.

Rendimiento de los extractos

Las partes aéreas de *E. nutans* colectadas en septiembre y en octubre fueron extraídas por separado con hexano, acetona y metanol. El rendimiento de cada extracto se calculó con el peso seco de la parte aérea de la planta entre el peso del extracto seco. El mayor rendimiento se obtuvo del extracto M2 (12.23%), mientras que el menor rendimiento lo tuvo el extracto A1 (5.36%) (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento de seis extractos de las partes aéreas de *E. nutans* con diferentes solventes.

Extracto	H1	H2	A1	A2	M1	M2
Rendimiento (%)	4.9	5.3	5.36	5.91	11.87	12.23

Rendimiento calculado a partir de la parte aérea de las plantas colectadas en septiembre (200 g) y octubre (107 g). H1: extracto hexánico (sept), H2: extracto hexánico (oct), A1: extracto acetónico (sept), A2: extracto acetónico (oct), M1: extracto metanólico (sept) y M2: extracto metanólico (oct).

El rendimiento de los extractos de *E. nutans* fue alto en comparación con el estudio de El-Mahmood (2009) que, a partir de 100 g de material vegetal, reportó para *E. hirta* un rendimiento de 3.9% para el extracto acuoso, 1.8% para el metanólico y 1.3% para el hexánico; mencionando que el agua podría ser el mejor solvente para obtener un mayor porcentaje de rendimiento. Comparando lo anterior, se puede apreciar en los extractos de *E. nutans* que el rendimiento aumenta conforme a la polaridad del solvente (Tabla 3).

Perfil fitoquímico

Las pruebas colorimétricas de los extractos de la parte aérea de *E. nutans* mostraron la presencia de fenoles, saponinas, glicósidos, terpenos, lactonas sesquiterpénicas, esteroides y taninos habiendo diferencias en la presencia de terpenos, esteroides, lactonas sesquiterpénicas y taninos entre los extractos obtenidos (Tabla 4).

En el género *Euphorbia* los estudios químicos han encontrado terpenos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, glicósidos cianogénicos y taninos, entre otros (Bittner et al., 2001). A pesar de la ausencia de alcaloides en *E. nutans*, en la especie *E. granulata* (perteneciente al subgen. *Chamaesyce* al igual que *E. nutans*) fueron reportados alcaloides y terpenos con actividad antibacteriana y antioxidante (Bousselessela et al., 2013). También Rizk (1986) menciona glicoalcaloides en *E. dracunculoides* y *E. hirta*, entre otros alcaloides. Otra planta del subgénero *Chamaesyce* es *E. humifusa*, reportada por Qingwang et al., (2011) como una especie con saponinas, triterpenos, cumarinas, lupeol, flavonoides y ácidos fenólicos. Éstos últimos son compuestos sintetizados en diferentes especies de *Euphorbia* (Noori et al., 2009). Se ha reportado el aislamiento de 7-glucósido, 5,7,4'-trihidroxi-flavona en *E. thymifolia* (Nagase 1942 en Singla y Pathak 1991). Flavonoles como la quercetina fueron aislados de extractos polares de *E. pilulifera* (Hallett y Parks 1951). Se han identificado 23 flavonoides en *E. stepposa* (Sotnikova y Litvinenko 1968; Sotnikova et al., 1968). Muller y Pohl (1970) aislaron seis flavonoides, todos siendo glicósidos de la ramnetina de *E. amygdaloides*. Parte de estos resultados concuerdan con los obtenidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Pruebas cualitativas para metabolitos secundarios en diferentes extractos de *E. nutans*.

METABOLITOS SECUNDARIOS	EXTRACTOS					
	H1	H2	A1	A2	M1	M2
Fenoles	-	-	+	+	+	+
Saponinas	-	-	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Glicósidos	+	+	+	+	+	+
Terpenos	+	+	-	+	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	-	-	+	+	-	+
Esteroides	+	+	-	+	-	-
Taninos	-	-	+	+	+	-

(+) indica una reacción positiva y (-) negativa. (+) azules representan diferencias temporales entre los extractos de mismo solvente.

Actividad antibacteriana

Evaluación cualitativa

Los extractos hexánicos de *E. nutans* H1 y H2 mostraron actividad antibacteriana ya que produjeron halos de inhibición de $(7.71 \pm 0.52 \text{ mm})$ y $(7.37 \pm 0.28 \text{ mm})$, respectivamente frente *S. aureus*. Mientras que los extractos acetónicos A1 y A2 fueron activos obteniendo halos de inhibición de $(9.89 \pm 0.51 \text{ mm})$ y $(8.18 \pm 0.56 \text{ mm})$, respectivamente en la misma cepa. Los extractos metanólicos M1 y M2 sólo tuvieron actividad bacteriostática, lo que quiere decir que no produce la muerte de la bacteria, sino que impide su reproducción (Tabla 5). Mientras que el promedio de los halos de inhibición del cloranfenicol, el control positivo, en *S. aureus* fue de $(23.72 \pm 0.86 \text{ mm})$ y en *S. epidermidis* fue de $(33.55 \pm 0.21 \text{ mm})$. Ningún extracto de *E. nutans* tuvo actividad sobre la cepa *S. epidermidis*.

Tabla 5. Actividad antibacteriana de seis extractos de *E. nutans*.

CEPA BACTERIANA	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)						
	C+	H1	H2	A1	A2	M1	M2
<i>S. aureus</i>	23.72± 0.86	7.71± 0.52	7.37± 0.28	9.89± 0.51	8.18± 0.56	BCT	BCT
<i>S. epidermidis</i>	33.55± 0.21	SA	SA	SA	SA	SA	SA

Los sensibilizados se probaron con 2 mg de extracto por disco. Datos expresados en mm±D.E. (C+): cloranfenicol, 30 µg/disco, SA: sin actividad, BCT: bacteriostático.

La actividad antibacteriana ha sido estudiada en algunas especies del subgénero *Chamaesyce*, por ejemplo, Tan (2007) reportó que el extracto etanólico de *E. humifusa* inhibe el crecimiento de *S. aureus*; Ahmad et al., (2011) utilizó el extracto metanólico de *E. prostrata* para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas gram positivas, como *Micrococcus luteus* y *S. aureus*, utilizando concentraciones semejantes (1 y 3 mg/sensidisco) a las empleadas en este proyecto. Del mismo modo, en otro estudio el extracto etanólico de *E. hirta* mostró inhibición directamente proporcional a la concentración en *S. aureus* (Ogbulie et al., 2007). Cabe destacar que Escamilla (2019), utilizó concentraciones de 2 mg/sensidisco de *E. nutans* y *E. hirta* en *S. aureus*, obteniendo inhibición sobre la bacteria.

Evaluación cuantitativa: Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

Los extractos hexánicos H1, H2, A1, M1 y M2 inhibieron el crecimiento de la población bacteriana, se obtuvo una CMI de 4 mg/mL sobre *S. aureus*. Sin embargo, la CMB de los anteriores extractos es superior a 4 mg/mL. Por lo que los extractos H1, H2, A1, M1 y M2 son considerados bacteriostáticos. El extracto acetónico del mes de octubre (A2) tiene una CMI de 2 mg/mL y una CMB de 4 mg/mL, éste fue el único con actividad bactericida. En este experimento hubo una disminución en la población bacteriana de hasta dos órdenes de magnitud, ya que el inóculo inicial de *S. aureus* fue de 4.5×10^4 UFC/mL y decreció a 6×10^2 en H1 5×10^2 en H2, 1×10^2 en A1 y M1 (Tabla 6 y Figura 6). Mohammadi et al., (2015) reportaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *E. condylocarpa* sobre diferentes bacterias patógenas en donde se obtuvo un CMI

de 7.5 mg/mL sobre *S. aureus*. Singh y Kumar (2013) reportaron que los flavonoides de *E. hirta* tienen una CMI de 0.312 mg/mL y una CMB de 0.625 mg sobre *S. aureus* y otros microorganismos.

Tabla 6. Efecto antimicrobiano de seis extractos de *E. nutans* para la determinación de CBM.

Extracto	Número de diluciones		
	1	2	3
	Número de sobrevivientes (UFC)		
H1	600	0	0
H2	500	200	0
A1	100	0	0
A2	CBM	0	0
M1	100	0	0
M2	1600	0	0

Unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* expuestas a 4 mg/mL de los seis extractos después de 24h. Las diluciones se hicieron en 5 mL de solución salina. Inóculo inicial de 4.5×10^4 UFC.

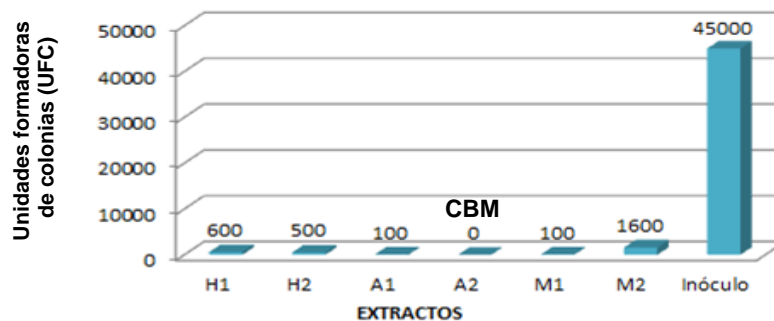


Figura 6. Número de sobrevivientes de *S. aureus* expuestas a seis extractos de *E. nutans*.

En el ensayo cuantitativo la población de bacterias fue obtenida de un inóculo inicial de 4.5×10^4 UFC/ml. El efecto de los extractos H1, H2, A1, M1, M2 tuvo actividad bacteriostática y el extracto A2 fue el único bactericida (CBM).

Actividad antifúngica

Los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de *E. nutans* colectada en septiembre y octubre no mostraron actividad antimicrobiana en el hongo *T. mentagrophytes* (Figura 7). A pesar de lo anterior, Singh y Kumar, (2013) también reportan la actividad antifúngica de *E. hirta* sobre *T. mentagrophytes*, sin embargo, sus extractos de flavonoides no tuvieron efecto inhibitorio o fungicida.

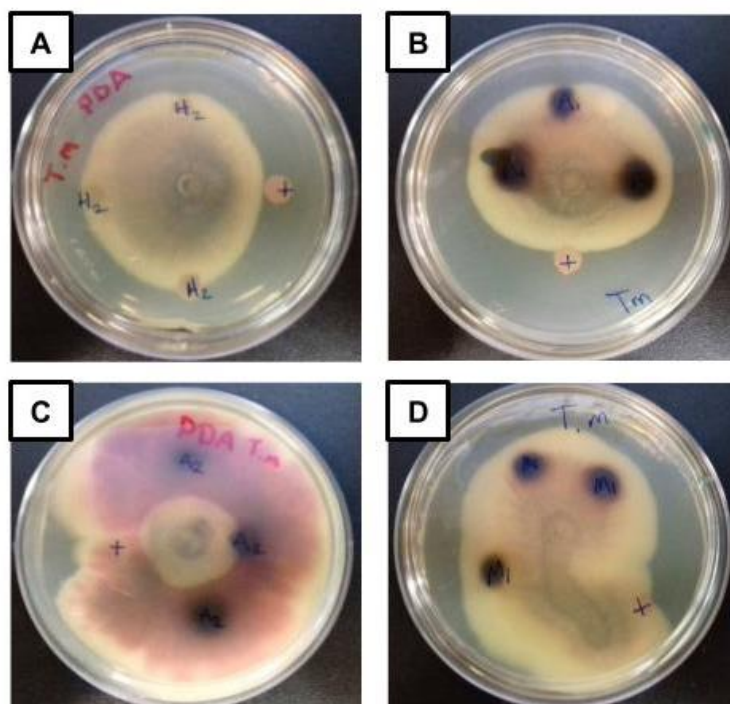


Figura 7. Inhibición del crecimiento radial de extractos de *E. nutans* sobre *T. mentagrophytes*.

A. Extracto hexánico H2; B. Extracto acetónico A1; C. Extracto acetónico A2; D. Extracto metanólico M1.

Análisis de variación temporal de los extractos activos de *E. nutans* por HPTLC

Perfil de terpenos

El HPTLC de los extractos H1, H2, A1 y A2 para detección de terpenos se hizo en una sola placa cromatográfica (Figura 8). Para facilitar el análisis de los resultados obtenidos se dividieron en dos partes: una para la descripción de los extractos hexánicos y otra para los extractos acetónicos (ver abajo).

Estándares

En la placa cromatográfica el estándar de ácido ursólico tuvo un Rf de 0.07 y la α -amirina tuvo un Rf de 0.34. En la zona de alta polaridad de la cromatografía se observa la mayor cantidad de bandas, y una de las que más resalta es aquella que está en el mismo Rf que el estándar amirina (Figura 8). Respecto a lo anterior, Martínez-Vázquez et al., (1999) reportaron β -amirina en *E. hirta* como uno de sus principales constituyentes triterpénicos, por lo tanto, puede ser β -amirina el principal compuesto perteneciente al grupo de los terpenos en *E. nutans*.

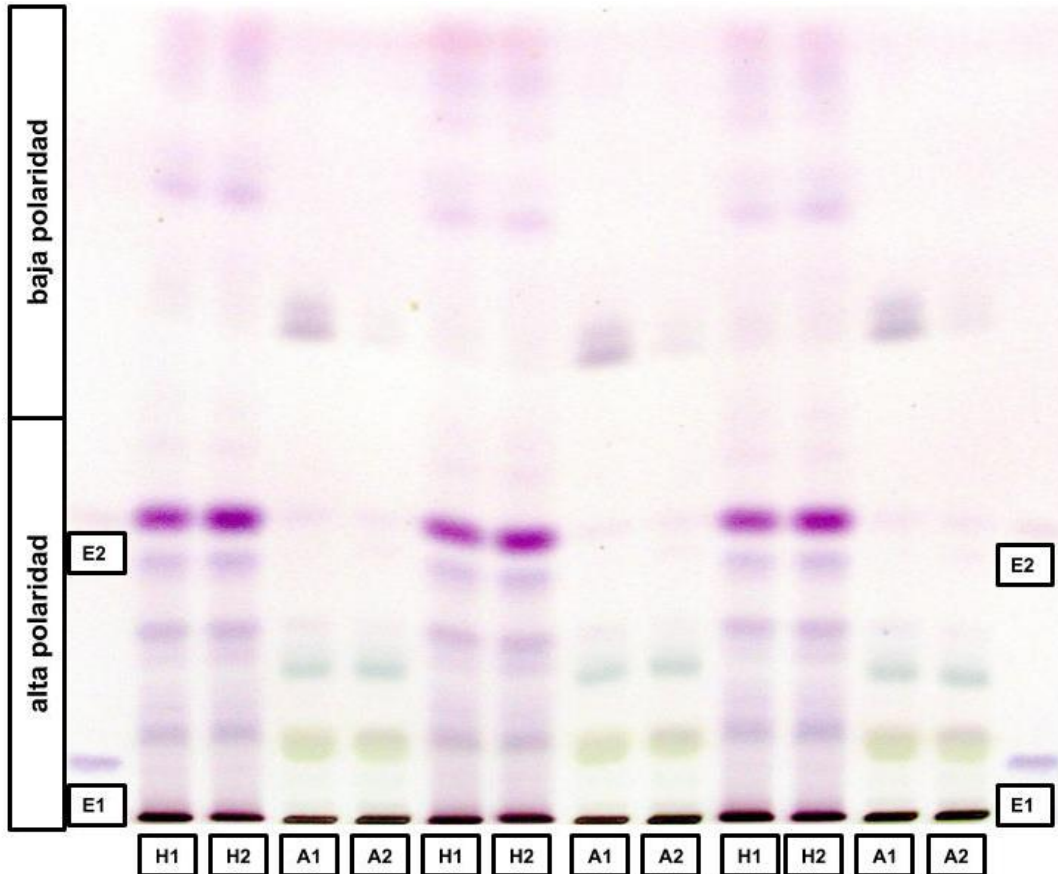


Figura 8. HPTLC de los extractos hexánicos y acetónicos de *E. nutans*.

Cromatografía de los cuatro extractos de la parte aérea de *E. nutans* para revelar la presencia de terpenos; **H1**. Extracto hexánico (sept); **H2**. Extracto hexánico (oct); **A1**. Extracto acetónico (sept); **A2**. Extracto acetónico (oct); **E1**. Estándar 1: ácido ursólico (Rf= 0.07); **E2**. Estándar 2: α amirina (Rf= 0.34); Fase móvil: Hex:AcOEt:ACN (8.2:1.8:0.1, v/v/v) revelado con anisaldehído bajo luz visible (580 nm).

Sustancias terpénicas (ST) detectadas en H1, H2, A1 y A2

Las sustancias terpénicas (ST) detectadas por el densitómetro en los extractos H1, H2, A1 y A2 fueron catorce, con un factor de retención (Rf) que va desde 0.04 a 0.90 (incluyendo la banda identificada como amirina). La abundancia de los compuestos va de 4.8 a 425 unidades de absorción (UA) (Figura 9).

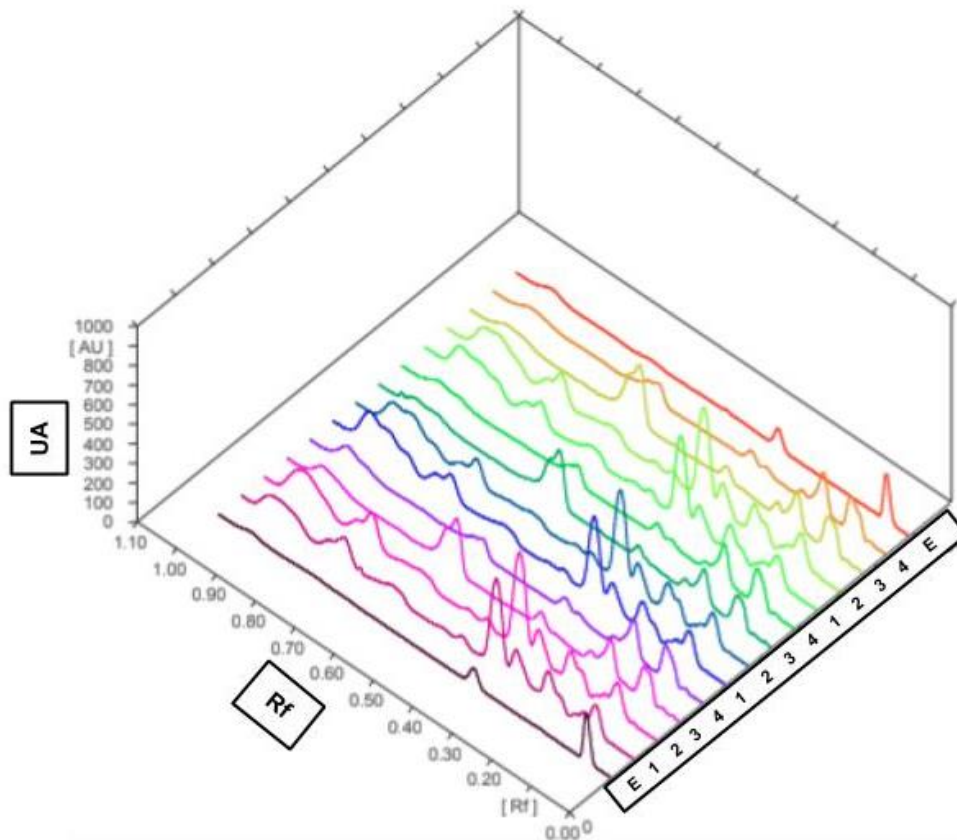


Figura 9. Cromatograma de perfil de terpenos de los extractos hexánicos y acetónicos de *E. nutans*.

UA: Unidades de absorción, **E:** carril de estándares, **1:** H1; **2:** H2; **3:** A1; **4:** A2.

Terpenos presentes en los extractos hexánicos

En la placa cromatográfica analizada por HPTLC se pudieron detectar once sustancias (amirina, ST1, ST2, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8, ST9 y ST10; mientras que ST3 sólo fue detectada en el extracto H1) (Tabla 7).

Tabla 7. Sustancias encontradas en el HPTLC de los extractos H1 y H2, para el perfil de terpenos.

Sustancias terpénicas de los extractos hexánicos	Extracto y abundancia (UA)	Factor de retención (Rf)
ST1	H1= 4.8 H2= 9.1	0.05
ST2	H1= 146.1 H2= 157	0.10
ST3	H1= 65.8	13
ST4	H1= 144.2 H2= 153.9	0.21
ST5	H1= 138 H2= 152.9	0.30
Amirina	H1= 425.3 H2= 473.7	0.34
ST6	H1= 39.1 H2= 41.9	0.42
ST7	H1= 20.6 H2= 28.1	0.46
ST8	H1= 60.1 H2= 55	0.57
ST9	H1= 129.9 H2= 158.3	0.72
ST10	H1= 137.9 H2= 145	0.90

(UA) Unidades de absorción. Cabe destacar que ST3 sólo se produjo durante el mes de septiembre.

Terpenos presentes en los extractos acetónicos

Los extractos A1 y A2 en el análisis de HPTLC muestran nueve sustancias distribuidas en la cromatografía: amirina, ST11, ST13, ST14, ST15, ST16, ST17 y ST18; mientras que ST12 sólo fue registrada en A1. En la zona de mayor polaridad se observan dos bandas de color verde, la de arriba más densa que la de abajo. Ambos carriles se observan semejantes, sin embargo, en la zona de baja polaridad se puede notar una diferencia en una banda (probablemente ST16) del carril A1 que se observa mucho más tenue en el carril A2 (Figura 8 y Tabla 8).

Tabla 8. Sustancias encontradas en el HPTLC de los extractos A1 y A2 para perfil de terpenos.

Sustancias terpénicas de los extractos acetónicos	Extracto y abundancia (UA)	Factor de retención (Rf)
ST11	A1= 10.0 A2= 14.36	0.04
ST12	A1= 160.2	0.09
ST13	A1= 181.6 A2= 196.9	0.17
ST14	A1= 61.5 A2= 39.9	0.21
ST15	A1= 17.3 A2= 34.9	0.30
Amirina	A1= 75.7 A2= 68.5	0.34
ST16	A1= 284.2 A2= 91.4	0.57
ST17	A1= 13.6 A2= 21.8	0.72
ST18	A1= 61.3 A2= 46.5	0.90

(UA) Unidades de absorción. Cabe destacar que ST12 sólo se produjo durante el mes de septiembre.

Variación temporal de terpenos en *E. nutans*

El compuesto con mayor abundancia en H2 fue la amirina (473.7 UA). A pesar de la diferencia de la cantidad de planta macerada (200 g en septiembre y 107 g en octubre), las sustancias terpénicas de *E. nutans* tuvieron mayor concentración en el H2 que en el H1. Por lo que la planta sintetiza mayor concentración de terpenos o fitoesteroles durante el mes de octubre que en septiembre. Solo la ST8 tuvo mayor abundancia durante el mes de septiembre.

En la Figura 10, bajo análisis de varianza de dos factores, se muestra que no hay variación entre los extractos H1 y H2 ($P < \alpha=0.05$; $P= 0.184$), pero si hay diferencia significativa entre las 8 sustancias terpénicas analizadas ($P= 3.32 \times 10^{-29}$), también existe diferencia significativa en la interacción de ambos factores (sustancias terpénicas y extractos) ($P= 5.59 \times 10^{-5}$). Lo que implica

que no hay diferencias en la concentración de las sustancias terpénicas entre los extractos hexánicos, pero si difiere la diversidad de los ocho terpenos y su presencia o ausencia, como es el caso de ST3.

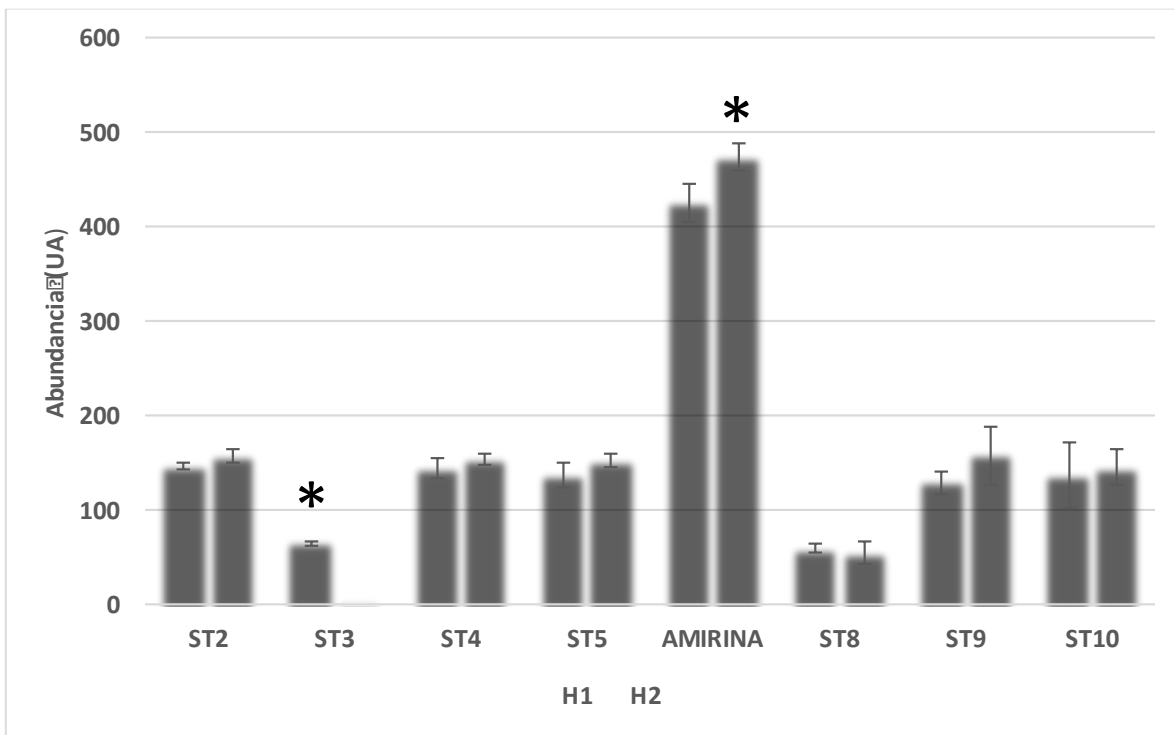


Figura 10. Variación de las sustancias terpénicas (ST) de los extractos hexánicos de *E. nutans*.

(*) representa diferencia significativa con base a desviación estándar entre los extractos H1 y H2 ($P > 0.05$).

En la Figura 11 se aprecia que ST12 solo estuvo presente en el extracto A1. En los extractos acetónicos destacan: ST13 con una concentración mayor del extracto A2 que del A1 y ST16 del extracto A1 (284.2 UA), el de mayor abundancia de los extractos acetónicos. De los extractos acetónicos A1 y A2 los valores de abundancia del densitómetro varían entre los extractos, así las sustancias terpénicas ST13, ST15 y ST17 fueron sintetizadas en mayor cantidad por *E. nutans* durante el mes de octubre, mientras que los compuestos ST12, ST14, ST16 y ST18 tuvieron mayor concentración en el mes de septiembre.

En la Figura 11 se muestra que hay diferencia significativa entre los dos extractos (A1 y A2) ($P = 2.16 \times 10^{-13}$), entre las 7 sustancias terpénicas ($P = 6.09 \times 10^{-24}$) y en la interacción de ambos factores (sustancias terpénicas y extractos) ($P = 1.16 \times 10^{-17}$). Esto quiere decir que si hay discrepancias en la concentración, presencia y ausencia (ST12) de los terpenos entre los dos extractos acetónicos, así como también difiere la diversidad de las ocho sustancias terpénicas.

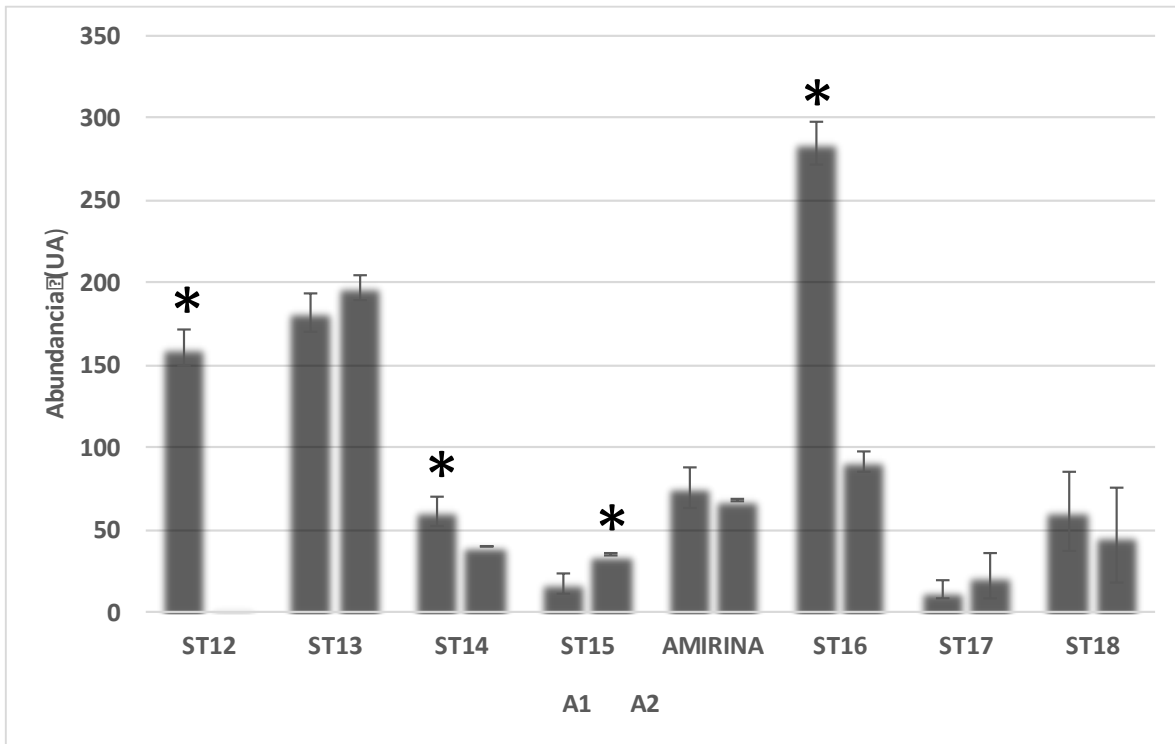


Figura 11. Variación de las sustancias terpénicas (ST) de los extractos acetónicos de *E. nutans*.

(*) representa diferencia significativa con base a desviación estándar. ($P > 0.05$)

La fluctuación en la producción de estos compuestos podría deberse al látex que sintetizan todas las euforbiáceas. En el género *Euphorbia* los triterpenos son el mayor componente del látex, dicho polímero blanco juega un rol en el almacenamiento de sustancias que aún no son utilizadas por la planta ya que muchos de los triterpenos no son un producto final metabólico (Nemethy et al., 1983).

Perfil de flavonoides glicosilados

Estándares

En cuanto a los estándares empleados para el análisis de flavonoides glicosilados en el HPTLC la rutina, un flavonoide glicosilado, en este sistema cromatográfico tuvo un Rf de 0.0 y la quercetina de 0.58, se aprecia una banda a la altura del estándar rutina, que podría ser un rutósido. En la zona de baja polaridad de la placa cromatográfica de todos los carriles se pueden distinguir dos bandas, una naranja (identificada como rutósido) y otra azul alcián (FG3), esta última con mayor concentración en A1 que en A2. El color naranja en las cromatografías de placa fina de flavonoides glicosilados (FG) puede ser debido a compuestos como las miricetinas, luteolinas y sus glucósidos derivados, como la rutina. Los compuestos de color azul fosforescente en esta fase móvil pueden ser derivados de ácido cafeico, ácidos clorogénicos o cumarinas (Wagner y Bladt, 1996). A partir del estándar quercetina hacia arriba se aprecian bandas poco nítidas de un color rojizo en todos los extractos (Figura 12).

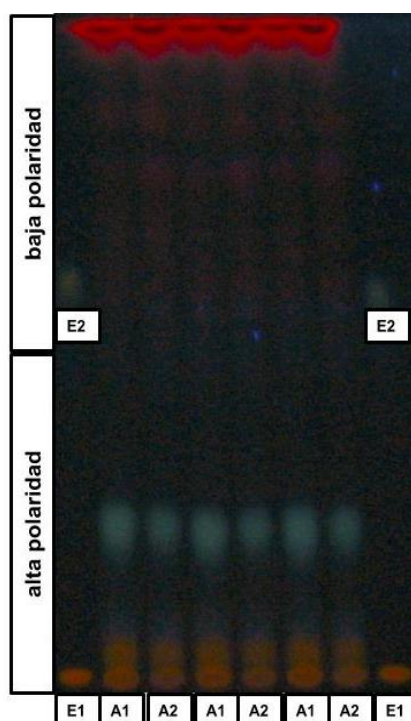


Figura 12. HPTLC de los extractos acetónicos de *E. nutans* para separar flavonoides glicosilados (FG).

Cromatografía de los cuatro extractos de la parte aérea de *E. nutans* para revelar la presencia de flavonoides glicosilados (FG); **A1** Extracto acetónico (sept); **A2** Extracto acetónico (oct); **E1**. Estándar 1 rutina (Rf= 0.0); **E2**. Estándar 2: quercetina; (Rf= 0.58) Fase móvil: AcOEt:ac. fórmico:ac.acético glacial:agua (100:11:11:20, v/v/v/v). Revelado con RPN a 365 nm.

Flavonoides glicosilados (FG) detectados en A1 y A2

En el cromatograma (Figura 13) se detectaron seis sustancias de tipo flavonoides glicosilados (FG), con R_f 's que van desde 0.04 a 0.84. La abundancia de los compuestos detectados va de 12.2 a 138.7 unidades de absorción (UA) (Tabla 9).

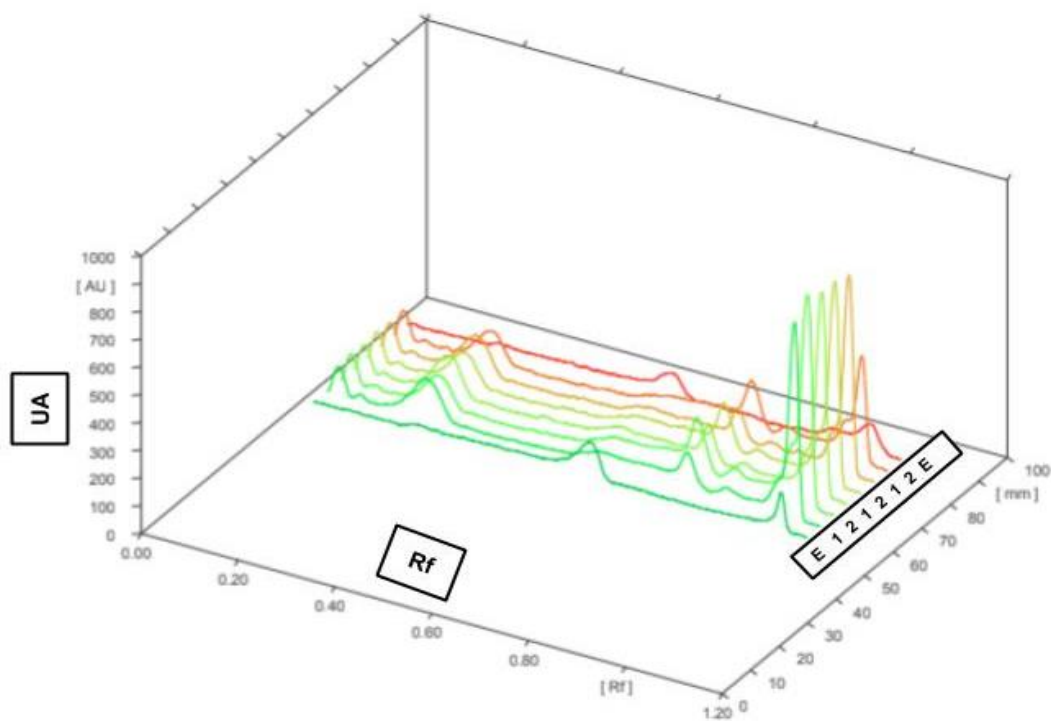


Figura 13. Cromatograma de perfil de flavonoides glicosilados de los extractos acetónicos de *E. nutans*.

UA: Unidades de absorción, E: carril de estándares, 1: carril de A1 y 2: carril de A2

Tabla 9. Flavonoides glicosilados (FG) encontrados en el HPTLC de los extractos A1 y A2 de *E. nutans*.

Flavonoides glicosilados	Factor de retención (Rf)	Extracto y abundancia (UA)
Rutósido	0.04	A1= 94.5 A2= 99.8
FG2	0.09	A1= 16.1 A2= 12.2
FG3	0.22	A1= 138.7 A2= 112.3
FG4	0.55	A1= 43.1 A2= 41.6
FG5	0.76	A1= 137.3 A2= 198.5
FG6	0.84	A1= 45.1 A2= 62.3

A1 Extracto acetónico (sept); A2 Extracto acetónico (oct). (UA) Unidades de absorción.

Variación temporal de flavonoides glicosilados en *E. nutans*

Los flavonoides glicosilados FG2, FG3 y FG4 se encuentran en mayor abundancia en A1 que en A2, por lo que son sintetizados más durante septiembre. Sin embargo, el rutósido, FG5 y FG6 se produjeron mayormente en el mes de octubre. El flavonoide glicosilado de mayor abundancia fue FG5 del A2 (198.5 UA) seguido de FG3 del A1 (138.7 UA) (Tabla 9). Sólo FG1, FG5 y FG6 fueron más abundantes en A2 que en A1. Cabe destacar el compuesto FG5 como posible agente bactericida, ya que su abundancia fue mayor en A2, el único extracto en el que se pudo determinar la CMB (Figura 6). No hay diferencia significativa entre los extractos A1 y A2, no obstante, si existe diferencia significativa entre la abundancia de los flavonoides glicosilados. En la Figura 14 se observa que hay diferencia significativa entre los dos tipos de extracto (A1 y A2) ($P= 0.00093$), entre los seis flavonoides glicosilados ($P= 1.82 \times 10^{-22}$) y en la interacción de ambos factores (FG's y extractos) ($P= 3.64 \times 10^{-09}$). Lo que significa que A1 y A2 difieren en la concentración de sus compuestos y también hay diferencia en la diversidad de los seis flavonoides glicosilados.

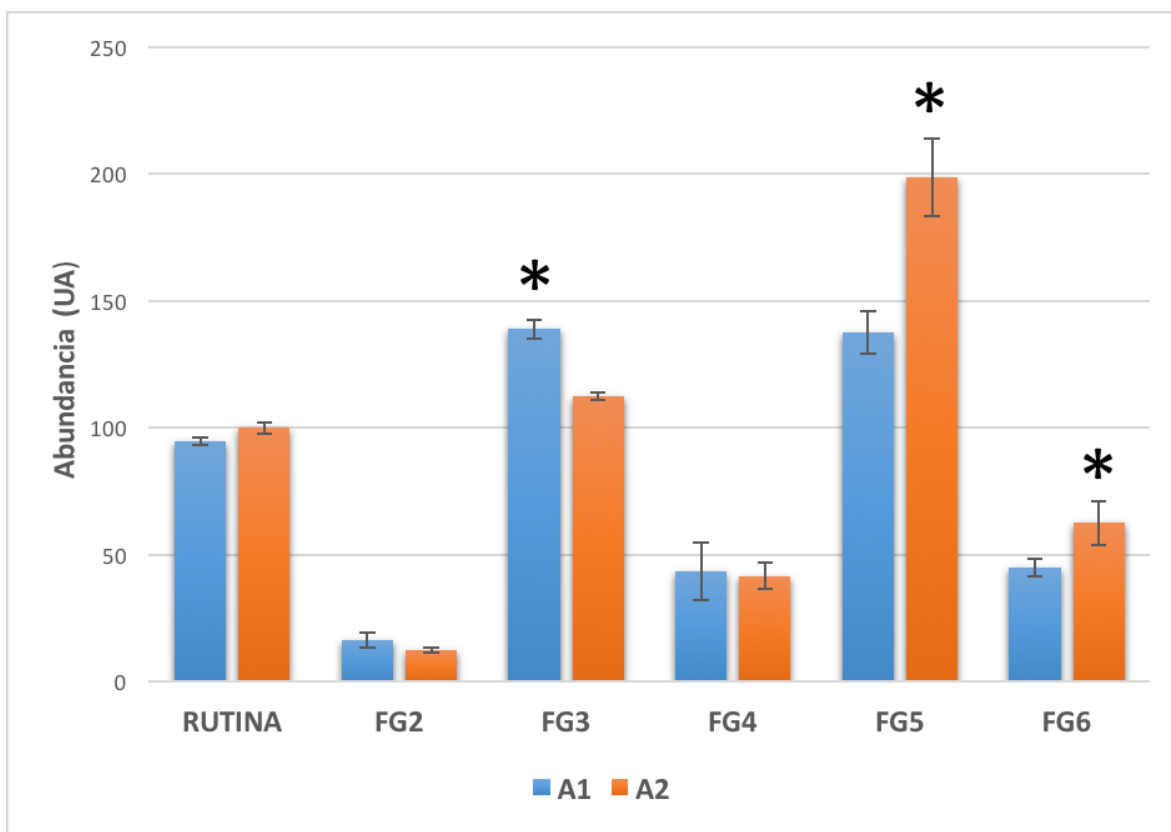


Figura 14. Variación de los flavonoides glicosilados en los extractos acetónicos de *E. nutans*.

(*) representa diferencia significativa con base a desviación estándar. ($P > 0.05$).

Perfil de agliconas

Estándares

En esta cromatografía (Figura 15) se mostró mayor cantidad de bandas en la zona de baja polaridad, el estándar rutina en esta fase móvil tuvo un R_f de 4.8 y el estándar quercetina tuvo un R_f de 0.95. Ya que se aprecia una banda a la altura del estándar rutina, ésta podría ser el mismo rutósido ya descrito para flavonoides glicosilados. A partir de ahí hacia arriba se muestran bandas color azul verdoso, amarillo y violeta en ese orden. El color amarillo puede deberse a compuestos como apigenina y sus derivados (Wagner y Bladt, 1996). Debido a la diferencia de abundancias también se distingue una mayor concentración en las bandas del carril A1 que en el A2.

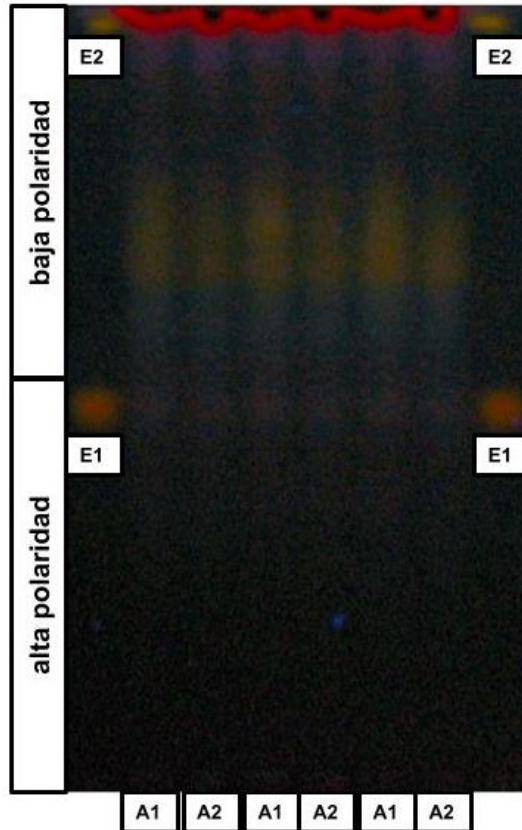


Figura 15. HPTLC de los extractos acetónicos de *E. nutans* para separar flavonoides de tipo aglicona (FA).

Cromatografía utilizada para dilucidar la presencia de agliconas. **A1.** extracto acetónico (sept); **A2.** Extracto acetónico (oct). **E1.** Estándar 1: rutina ($R_f= 0.48$); **E2.** Estándar 2: quercetina ($R_f= 0.95$). Fase móvil: (CHCl_3): Ac:ac.fórmico (3.5:1:0.5, v/v/v). Revelado con RPN a 365 nm.

Agliconas (FA) detectadas en A1 y A2

Los flavonoides tipo aglicona (FA) detectados por el densitómetro fueron 5, con un R_f que va desde 0.21 a 0.84, con una abundancia de los compuestos fenólicos que va de 28.9 a 284.5 unidades de absorción (UA) (Figura 16). La abundancia de los FA de *E. nutans* del mes de septiembre es mayor a los del mes de octubre (Tabla 10).

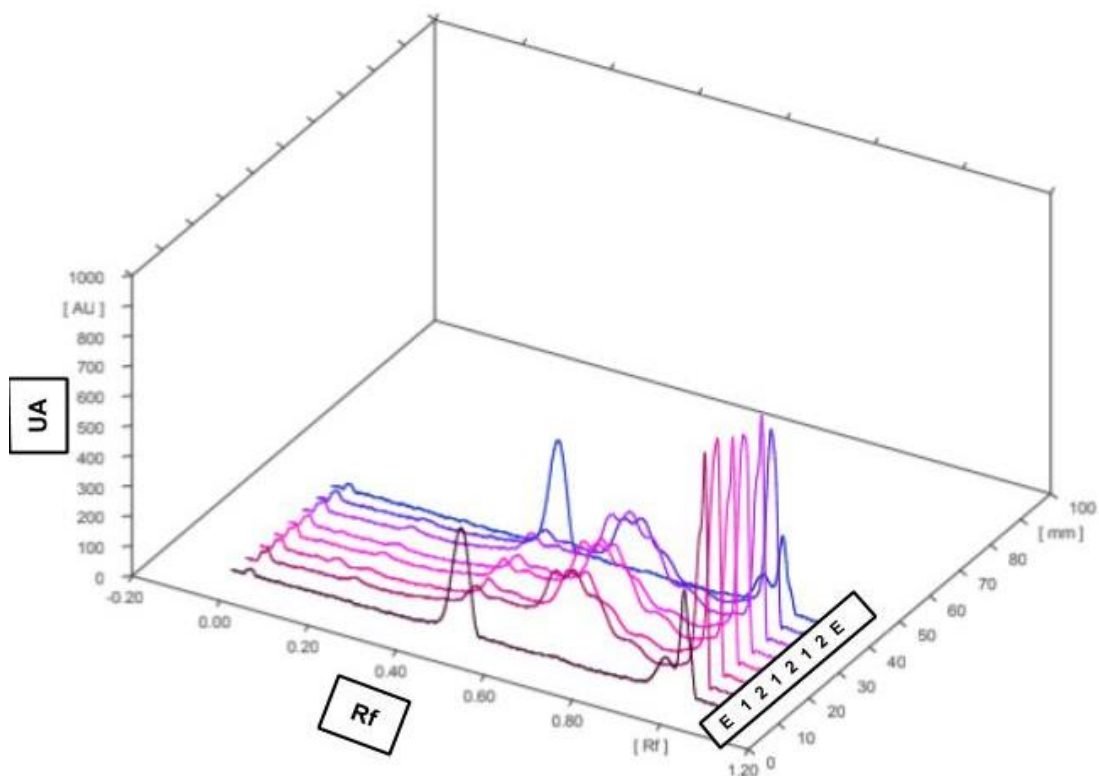


Figura 16. Cromatograma de perfil de agliconas de los extractos acetónicos de *E. nutans*.

UA: Unidades de absorción, E: carril de estándares, 1: carril de A1 y 2: carril de A2.

Tabla 10. Agliconas (FA) encontradas en el HPTLC de los extractos A1 y A2 de *E. nutans*.

Agliconas	Factor de retención (Rf)	Extracto y abundancia (UA)
FA1	0.21	A1= 41.6 A2= 28.9
rutósido	0.48	A1= 130.5 A2= 105.4
FA2	0.67	A1= 262.9 A2= 214.3
FA3	0.71	A1= 284.5 A2= 228
FA4	0.81	A1= 94.8 A2= 60.85

A1 Extracto acetónico (sept); A2 Extracto acetónico (oct). (UA) Unidades de absorción.

Variación temporal de agliconas en *E. nutans*

La Figura 17 muestra que en la cromatografía para dilucidar este grupo de compuestos fenólicos el extracto A1 siempre tuvo mayor abundancia en sus metabolitos que el extracto A2. La aglicona más abundante de los extractos acetónicos de *E. nutans* fue FA3 del A1 (284.5 UA), seguido de FA2 (262.9 UA). En general los metabolitos tuvieron mayor concentración en el extracto A1 que en el A2 (Figura 16), dicho tipo de flavonoides es sintetizado en mayor concentración por *E. nutans* durante el mes de septiembre. Lo que podría explicar mayor abundancia de compuestos polares en los meses en los que aún no hay estrés por sequía y el suelo aún no está seco. En la Figura 17 se observa que existe diferencia significativa entre los dos extractos (A1 y A2) ($P=2.44 \times 10^{-07}$) y entre los 5 flavonoides de tipo aglicona ($P=1.60 \times 10^{-17}$), pero no existe significancia entre ambos factores. Esto implica que A1 y A2 no son semejantes en la concentración de sus compuestos y que difieren en la diversidad de las agliconas.

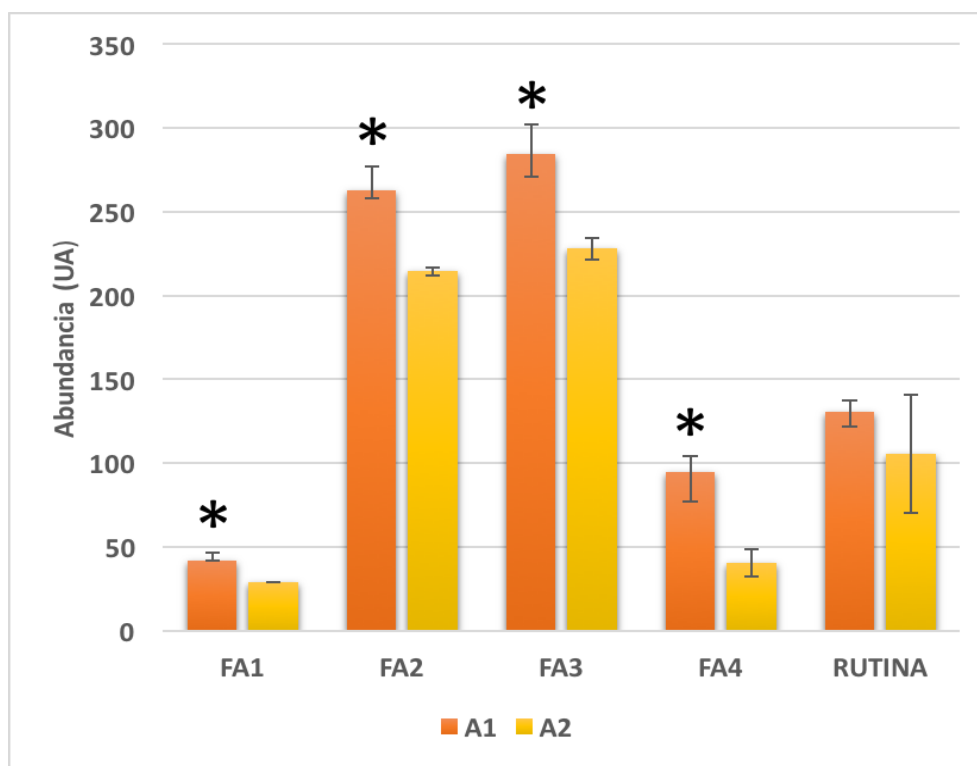


Figura 17. Variación de agliconas (FA) en los extractos acetónicos de *E. nutans*.

(*) representa diferencia significativa con base a desviación estándar ($P > 0.05$).

En la zona de colecta, Las Barrancas de Tonatico, la vegetación que predomina es de tipo bosque tropical caducifolio, en donde la insolación, temperatura y cantidad de agua fluctúan por la estacionalidad de lluvias-secas, lo que puede afectar la producción de metabolitos secundarios y las propiedades biológicas de las plantas como *E. nutans*. Estas variaciones en la producción de metabolitos secundarios podrían deberse a las condiciones ambientales cambiantes, las cuales influyen en la capacidad de las plantas para adaptarse Root (1967) define que adaptación es el ajuste fenotípico de un organismo a su entorno, que confiere un grado de protección contra adversidades como temperatura, herbivoría, parásitos y sequía. Falconer (1989) establece la plasticidad de caracteres de una especie como el efecto genotípico provocado por la interacción con el ambiente. Por lo que pueden generarse distintos fenotipos en diversas condiciones ambientales. Las variaciones morfológicas inducidas por el ambiente suceden después de una exposición continua durante el ciclo de vida, aunque las variaciones fisiológicas se presentan a los pocos días (Valladares, 2006).

4. CONCLUSIONES

- El rendimiento del extracto metanólico de *E. nutans* colectada en octubre es el de mayor porcentaje.
- El perfil fitoquímico de la parte aérea de *E. nutans* muestra que contiene lactonas sesquiterpénicas, taninos, terpenos, esteroides, saponinas, fenoles y glicósidos.
- Los extractos de *E. nutans* inhibien el crecimiento de *S. aureus*.
- Los extractos hexánicos, metanólicos y el extracto acetónico de septiembre de la parte aérea *E. nutans* tuvieron un efecto bacteriostático mientras que el extracto acetónico de octubre tuvo un efecto bactericida sobre *S. aureus*.
- *E. nutans* contiene catorce sustancias terpénicas incluyendo amirina; seis flavonoides glicosilados; y cinco flavonoides tipo aglicona.
- *E. nutans* tiene variación temporal en dos tiempos de colecta sobre la producción de metabolitos secundarios.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad M., A. Saboor Shah, R. A. Khan, F. U. Khan, N. A. Khan, M. S. Shah y M. R. Khan. 2011. Antioxidant and antibacterial activity of crude methanolic extract of *Euphorbia prostrata* collected from District Bannu (Pakistan). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(8):1175-1178.
2. Aguilar A., J. R. Camacho, S. Chino, P. Jaques, M. E. Lopez. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social: Información etnobotánica. México: Ed. IMSS.
3. Annapurna J., I.P. Chowdary, G. Lalitha, S.V. Ramakrishna y D.S. Iyengar. 2004. Antimicrobial Activity of *Euphorbia nivulia* Leaf Extract. *Pharmaceutical Biology* 42 (2): 91–93.
4. Ankli A., O. Stitche y M. Heinrich. 1999. Medical ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers' consensus as a quantitative criterion. *Economic Botany* 53: 144-160.
5. Bittner, M., J. Alarcón, P. Aqueveque, J. Becerra, V. Hernández, M. Hoeneisen y M. Silva. 2001. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46 (4).
6. Bousselessela H., M. Yahia, A. Mahboubi, S. Benbia y Y. Massinissa. 2013. Antioxydant and antibacterial activity of alkaloids and terpenes extracts from *Euphorbia granulata*. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Bioengineering and Life Sciences* 7 (3) 166-169.
7. Domínguez X. A. 1985. Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Limusa, 3a ed. México.
8. Eisenstadt, E., Carlton, B. C. Brown, B. J. 1994. Gene Mutation. En: Gerhardt, P. (ed). *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM, Washington D. C. USA. pp. 297-303.
9. El-Mahmood M. A. 2009. Antibacterial activity of crude extracts of *Euphorbia hirta* against some bacteria associated with enteric infections. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (7): 498-505.
10. Ernst, M., O. M. Grace, H. Saslis-Lagoudakis, N. Nilsson, H. T. Simonsen y N. Rønsted. 2015. Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 176: 90–101.
11. Escamilla R. A. A. 2019. Caracterización química y biológica de algunas plantas utilizadas para el tratamiento de padecimientos cutáneos localizadas en Tonicato, Estado de México. Tesis para obtener el título de Bióloga. FES Iztacala, UNAM.
12. Falconer, D. S. 1989 *Introducción a la genética cuantitativa*. México: Compañía Editorial Continental.
13. Fernández S. M. 2014 Protocolo de tratamiento empírico de las infecciones de piel y tejidos blandos. *Medicine* 12 (37): 2205-2262.
14. García A. C., J. Pardo V., C. y Seas R. 2003. Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso. *Revista Médica Hederiana* 14 (4).
15. García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Libros.
16. Gil, O. R., A. C. Carmona y A. M. Rodríguez A. M. C. 2006. Estudio etnobotánico de especies tóxicas ornamentales y medicinales de uso popular, presentes en el Jardín de Plantas

Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. *Boletín Antropológico*, 24(68): 463-481.

17. Gupta, A. K., R. Baran y R. C. Summerbell. 2000. *Fusarium* infections of the skin. *Current Opinion in Infectious Diseases* 13 (2):121-128.
18. Hallett, F.P. y L.M. Parks. 1951. A note on isolation of quercetin from *E. pilulifera*. *Journal of American Pharmaceutical Association* 40: 56–7.
19. Harker, M., García Rubio L. A., Rioja-López M. E. 2008. Composición florística de cuatro hábitats en el Rancho Las Papas de Arriba, Municipio de Ojuelos de Jalisco, Jalisco, México. *Acta Botanica Mexicana* 85, 1-29.
20. Hernández, M. I. 2000. Colectores emisores y plantas de tratamiento de aguas residuales de las localidades Ixtapan de la Sal-Tonatico, Estado de México. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Civil. FES Aragón, UNAM.
21. Hooper M. 2002. Major herbs of Ayurveda. Netherlands, Elsevier Health Sciences, Elsevier.
22. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2000. Carta E14, A47. Revisada en noviembre del 2017. <https://www.inegi.org.mx/temas/topografia/>
23. Jáuregui-Ostos, E. y Vidal-Bello, J. 1981. Aspectos de la climatología del Estado de México. *Boletín del Instituto de Geografía* 11:21-54.
24. Jork H., W. Funk, W. Fischer, H. 1990. Wimmer. Thin Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods. Volume 1a, Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I. Alemania: Ed. VCH.
25. Kirbag, S., P. Erecevit, F. Zengin y A. N. Guvenc. 2013. Antimicrobial activities of some *Euphorbia* species. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines* 10(5):305-309
26. Khalil I. y Al-Mughrabi. 2003 Antimicrobial activity of extracts from leaves, stems and flowers of *Euphorbia macroclada* against plant pathogenic fungi. *Phytopathología Mediterránea* 42: 245–250
27. Koneman, E., S. D. Allen, V. R. Dowell, H. M. Summers. 1996. Diagnóstico microbiológico. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.
28. Lorente L. M. A. 2003. Estudio Farmacognóstico de *Euphorbia hirta* L. Tesis Doctoral en Biología. Universidad de Granada, España.
29. Lai X.Z., Y. B Yang, X. L. Shan. 2004. The Investigation of Euphorbiaceous Medicinal Plants in Southern China. *Economic Botany* 58: 307-320
30. Luna, C. R. 2014. Flora de las Barrancas de Tonatico. Estado de México, México (Tesis de Licenciatura en Biología). FES Iztacala, UNAM.
31. Madureira A. M., C. Valente, A. C. Bastos, J. R. Ascenso, M. J. U. Ferreira. 2002. Study of the methanol extract of *Euphorbia segetalis*. Pr. *Phytochemistry Society* 47: 65-71.
32. Martínez G. M., J. Jimenez, R. Cruz, E. Juarez, R. García, A Cervantes y R. Mejía. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología: Serie Botánica* 73(2): 155-281.

33. Martínez-Vázquez, M., R. Bye, E. Lazcano y M. Apan (1999). Anti-inflammatory Active Compounds from the n-Hexane Extract of *Euphorbia hirta*. *Revista de la Sociedad Química de México*. 43.
34. Mohammadi S., V. Asgary, S. A. Sadat, E. Heidari, H. Jozaghkar, R. A. Cohan y A. Mirzaie. 2015. Antimicrobial Activity of Methanolic Root Extracts of *Euphorbia condylocarpa* against Pathogenic Bacteria. *Advanced Studies in Biology* 7 (2) 55-64.
35. Monroy, G. R. 2016. Conocimiento tradicional de plantas medicinales en la localidad de origen Otomí Jiquipilco el Viejo, Temoaya, México. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias y Rurales. Universidad Nacional del Estado de México.
36. Muller R., y R. Pohl. 1970. Flavonol glycosides of *Euphorbia amygdaloides* and their quantitative determination. *Planta Medica* 18 (2): 114–29.
37. Mwine J. T. y P. Van Damme. 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(5), p5p. 652-662.
38. Nemethy E. K., C. Skrukud, G. J. Piazza y M. Calvin. 1983. Terpenoid biosynthesis in *Euphorbia latex*. *Biochimica et Biophysica Acta* 760: 343-349.
39. Noori M., A. Chehreghani y M. Kaveh. 2009. Flavonoids of 17 species of *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in Iran. *Toxicological & Environmental Chemistry* 91:4, 631-641.
40. Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas* 62: 12-15.
41. Ogbulie J. N., C. C. Ogueke, I. C. Okoli y B. N. Anyanwu. 2007. Antibacterial activities and toxicological potentials of crude ethanolic extracts of *Euphorbia hirta*. *African Journal of Biotechnology* 6 (13): 1544-1548.
42. Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Natural Reviews of Microbiology* 7(8): 555–567.
43. Pahlevani, A. H. y R. Riina. 2011. A synopsis of *Euphorbia* subgen. *Chamaesyce* (Euphorbiaceae) in Iran. *Annals of Botany Fennici* 48: 304-316.
44. Papp N. 2004. Antimicrobial activity of extracts of five hungarian *Euphorbia* species and some plant metabolites. *Acta Botanica Hungarica* 46 (3–4): 363–371.
45. Qingwang, L., W. Han, H. Zengsheng, W. Peijun y Li Kun. 2011. Flavone-saponin extract of *Euphorbia humifusa* herb and application. Disponible en: <https://www.google.com/patents/CN102429951A?hl=es&cl=en#npl-citations>
46. Rizk Abdel-Fattah M. 1986. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 94: 293-326.
47. Rojas, H. N. M., Avellaneda S. S. y D. A. Cuellar C. 2010. Plantas empleadas en medicina tradicional en Tierra Caliente, Guerrero, México para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Revista Colombiana de Ciencias Animales* 2(1).
48. Root R. B. 1967. The niche exploitation pattern of the blue-gray gnatcatcher. *Ecological Monographs* 37: 317-350.

49. Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski. 2006. *Flora fanerogámica del Valle de México*. México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán).
50. Salmaki, Y., S. Zarrea, E. Hans-Joachim y G. Heubl. 2011. Seed and gland morphology in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) with focus on their systematic and phylogenetic importance, a case study in Iranian highlands. *Flora* 206: 957–973.
51. Sánchez-Blanco, J. y Guevara-Fefer F. 2013. Plantas arvenses asociadas a cultivos de maíz temporal en suelos salinos de la ribera del lago de Cuitzeo, Michoacán, México. *Acta Botanica Mexicana* 105: 107-129.
52. Sánchez-Schmidt, J. M., Vicente-Villa A. y González-Ensenyat M. A. 2005. La piel en la práctica diaria. Manifestaciones cutáneas en las candidiasis perinatales. *Piel* 20(9): 450-456.
53. Shi, Q.-W., Su, X.-H. y Kiyota, H. 2008. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chemical Reviews* 108(10), 4295–4327.
54. Singh, G., y Kumar, P. 2011. Extraction and antimicrobial activity of alkaloids of *Euphorbia hirta*. *Journal of Pharmacy Research* 4(4), 1228-1230.
55. Singh, G., y Kumar, P. 2013. Phytochemical study and screening for antimicrobial activity of flavonoids of *Euphorbia hirta*. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* 3(2): 111–116.
56. Singla, A.K. y K. Pathak. 1991. Phytochemistry of *Euphorbia* species. *Fitoterapia LXI* 6: 483–516.
57. Sotnikova, O.M., R.K. Chagovets, y V.I. Litvinenko. 1968. New flavonone compounds from *Euphorbia stepposa*. *Chemistry of Natural Compounds* 4 (2): 71–4.
58. Sotnikova, O.M. y V.I. Litvinenko. 1968. Isomyricitrin from *Euphorbia stepposa*. *Chemistry of Natural Compounds* 4 (1): 42–3.
59. SPP (Secretaría de Programación y Presupuesto). 1981. Síntesis Geográfica del Estado de México. Coordinación general de los servicios nacionales de estadística, geografía e informática. México. D.F. 174 p.
60. Steibel P. E. 1995. Las euforbiáceas (Euphorbiaceae Juss.) nativas naturalizadas y adventicias de la provincia de la Pampa, República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía-UNLPam*. 8: 2.
61. Tan H. 2007. Bacteriostasis test on the flavonoid compounds from *Euphorbia humifusa* Willd. in vitro. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine* 4.
62. Tripathi S. C. y M. Srivastava. 2010. Ethnomedicinal flora of Euphorbiaceae used in dermatological problem. *Indian Journal Of Traditional Knowledge* 9(2): 318-320.
63. Valladares F. 2006. ¿Por qué las plantas difieren en su plasticidad fenotípica? Una perspectiva ecofisiológica sobre la canalización. 2º Congreso Ibérico de Ecología, Lisboa.
64. Wagner H. y S. Bladt. *Plant Drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas*. 2da Ed. Springer. 1996. pp. 335-338.
65. Wang, H. y T. N. Bun. 2002. Isolation of an Antifungal Thaumatin like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61: 1-6.

66. Weston, William L., Lane Alfred T., Morelli Joseph G. 2008. Dermatología pediátrica. España: Elsevier, 4ta ed..

CRÉDITOS DE FOTOGRAFÍAS

Figura 1. Algunas características de la familia Euphorbiaceae. **A.** Flor de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) Foto: Carlos Velazco, disponible en: <https://www.flickr.com/photos/aztekium/4721615694/> Consultado en enero del 2019. **B.** *Hevea brasiliensis*, disponible en: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/hevea-brasiliensis/?lang=es> Consultado en enero del 2019. **C.** Ciatío de *Euphorbia corollata*. Foto: L. Nickrent, K.R. Robertson, disponible en: http://courses.washington.edu/bot113/family_pages/Euphorbiaceae/euphorbiaceae.html Consultado en enero del 2019. **D.** Fruto común de Euphorbiaceae; Foto: dominio público, disponible en: <http://thegolfclub.info/related/small-toothed-euphorbia.html> Consultado en enero del 2019.

Figura 2. *Euphorbia nutans*. **A.** Látex y pubescencia en hojas; Foto: dominio público, disponible en: http://www.missouriplants.com/Whiteopp/Euphorbia_nutans_page.html Consultado en enero del 2019. **B.** Hábito de la planta; Foto: Paul Rothrock, disponible en: <http://intermountainbiota.org/portal/imagelib/imgdetails.php?imgid=10398966> Consultado en enero del 2019. **C.** Hojas; Foto: dominio público, disponible en <https://michiganflora.net/species.aspx?id=1259> Consultado en enero del 2019. **D.** Frutos y flores. Foto: Roxanna Martin, disponible en: http://www.namethatplant.net/picpage.shtml?path=/Images/ImagesFire/rlm/rlm82210_18b.jpg&plant=562&photo=13229 Consultado en enero del 2019.