



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD**

**ANTIMICROBIANA DE TRES PLANTAS UTILIZADAS EN EL**

**MUNICIPIO DE TONATICO, ESTADO DE MÉXICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. MARÍA FERNANDA CHÁVEZ ESTRADA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**DR. RICARDO REYES CHILPA**

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**Los Reyes Iztacala, Estado de México, Septiembre, 2021**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DE TRES PLANTAS UTILIZADAS EN EL  
MUNICIPIO DE TONATICO, ESTADO DE MÉXICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. MARÍA FERNANDA CHÁVEZ ESTRADA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**  
**DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**COMITÉ TUTOR:**  
**DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
**DR. RICARDO REYES CHILPA**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2021**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/725/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de marzo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Experimental)** de la estudiante **CHÁVEZ ESTRADA MARÍA FERNANDA** con número de cuenta **413046394** con la tesis titulada **“Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de tres plantas utilizadas en el Municipio de Tonatico, Estado de México”**, realizada bajo la dirección de la DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. CLAUDIA TZASNÁ HERNÁNDEZ DELGADO  
Vocal: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ  
Vocal: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO  
Vocal: DRA. GABRIELA BÁRCENAS MORALES  
Secretario: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de agosto de 2021

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad y el apoyo en mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca recibida que me permitió realizar mis estudios de maestría (No. CVU 959494).

Al proyecto PAPIIT IN220920 *Estudio farmacognóstico de algunas plantas empleadas para tratar padecimientos cutáneos en Tonatico, Estado de México* por el financiamiento para la realización de este proyecto.

A mi directora de tesis, Dra. Ana María García Bores y a los miembros de mi Comité Tutor: Dra. Patricia Guevara Fefer y Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su asesoría y valiosas aportaciones a este trabajo.

## **AGRADECIMIENTO A TÍTULO PERSONAL**

Primero quiero agradecer a mi tutora principal Dra. Anita García, por ser más que una guía académica. Por todas esas horas de charlas académicas y personales, por todos esos abrazos que hicieron que las penas dolieran menos, porque con solo una sonrisa aligeraba las dificultades, por todas las palabras de aliento y apoyo emocional en los tiempos de pandemia, por su comprensión en mis tiempos de crisis. Gracias infinitas.

A la Dra. Nany, por interrumpir sus actividades para resolvernos nuestras dudas, por el tiempo que dedica para platicar con nosotros y siempre animarnos a seguir adelante sobre todo en esos días en los que sentimos que no podemos más.

A la Dra. Monch por compartir parte de su vida conmigo, por escucharme y dejarse escuchar. La quiero muchísimo.

A mi amiga la casi Dra. Nallellita, gracias por ser como una hermana mayor para mí, por tenerme confianza, por escucharme y ayudarme a quererme como soy, por alentarme a conocer el mundo, por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. Gracias por estar.

A los doctores que forman parte del laboratorio de Fitoquímica y del laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, Dr. Memo por contagiarnos esa pasión por la Ciencia, Dr. Estrella por estar siempre dispuesto a ayudarnos, Dr. Isrra, Dra. Chio, Dra. July, Maestro Erick y Nashe por apoyarnos y ayudarnos en el trabajo de laboratorio.

A Rebe, Gelos, Mitzi, Ángel, Migue, Isaac, Morgan y Leo por esas platicas que hacían que los arduos días de trabajo pasaran más rápido, gracias hacer el laboratorio más divertido.

A Nadia, Dulce, Angy y Azu mis amigas incondicionales, mis hermanas, no tengo palabras para expresar lo afortunada que soy por tenerlas en mi vida, gracias por ser las maravillosas personas que son. No importa donde esté, siempre contarán conmigo.

A todos mis amigos, por esos hermosos momentos que hemos pasado juntos, son mi segunda familia, gracias por enseñarme que las alegrías y las penas se pueden compartir.

A toda mi familia, porque sin ellos nada de esto habría sido posible, ustedes son el pilar de mi vida, gracias por creer en mí, los amo.

## DEDICATORIAS

A mi madre Lucy: por siempre apoyar mis decisiones y ayudarme a cumplir mis metas y sueños. Eres la mujer más fuerte que conozco.

A mi padre Félix: por cuidarme desde las estrellas, no importa que pase el tiempo, mis logros también son gracias a ti.

A mis tíos Juanita, Felipe: por sus bendiciones, su amor y apoyo.

A mi hermano Omar, mis primos Gaby, Toño, Tere, Álvaro, Edu y Jessy: por cuidarme, guiarme y estar siempre dispuestos a ayudar.

A mi tía Rosita y mi abuelita: su pérdida dejó un vacío en mi corazón, pero siempre estarán en mis pensamientos más hermosos.

A mis sobrinos: Por recordarme que la curiosidad es una de las mejores virtudes, por sus pequeñas sonrisas y apapachos, los amo infinitamente.

*“Un científico en su laboratorio no es un simple técnico, también es un niño que se enfrenta a fenómenos naturales que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas”*

**Marie Curie**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Descripción botánica de las especies	9
<i>Ficus petiolaris</i> Kunt (THEPLANTLIST: kew-2811713.)	9
<i>Ficus cotinifolia</i> Kunt (THEPLANTLIST: kew-2810059)	12
<i>Acalypha mollis</i> Kunt (THEPLANTLIST: kew-900)	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. PREGUNTA CIENTÍFICA	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos particulares	18
6. ANTECEDENTES	19
6.1. Género <i>Ficus</i> L.	19
6.1.1. Antecedentes etnobotánicos	19
6.1.2. Antecedentes fitoquímicos y de actividad biológica	20
6.1.3. Compuestos químicos con actividad antimicrobiana	20
6.1.4. Antecedentes en México	21
6.2. Género <i>Acalypha</i> L.	22
6.2.1. Antecedentes etnobotánicos	22

6.2.2. Antecedentes fitoquímicos y de actividad biológica	23
6.2.3. Compuestos químicos con actividad antimicrobiana	24
6.2.4. Antecedentes en México	25
<b>7. ESTRATEGÍA METODOLÓGICA</b>	<b>26</b>
<b>Etapa I</b>	<b>28</b>
7.1. Evaluaciones preliminares de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	28
7.1.1. Colecta y determinación taxonómica del material vegetal	28
7.1.2. Obtención de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	28
7.1.3. Caracterización química cualitativa de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	28
7.1.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana cualitativa de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	30
Actividad antibacteriana cualitativa	30
Actividad antifúngica cualitativa	30
<b>Etapa II</b>	<b>31</b>
7.2. Estudio de <i>A. mollis</i> 2018	31
7.2.1. Recolecta del material vegetal y obtención de extractos de <i>A. mollis</i> 2018	31
7.2.2. Caracterización química cualitativa de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	31
7.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	31
Evaluación de la actividad antibacteriana cualitativa	31
Evaluación de la actividad antifúngica cualitativa	32
Evaluación de la actividad antibacteriana cuantitativa	32
<b>Etapa III</b>	<b>33</b>
7.3. Fraccionamiento biodirigido de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	33
7.3.1. Extracto hexánico (EH)	36
7.3.2. Extracto acetónico (EA)	38

7.3.3. Extracto metanólico (EM)	40
<b>8. RESULTADOS</b>	42
<b>Etapa I</b>	42
8.1. Evaluaciones preliminares de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	42
8.1.1. Colecta del material vegetal	42
8.1.2. Rendimiento de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	42
8.1.3. Caracterización química cualitativa de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	43
8.1.4. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	45
Actividad antibacteriana cualitativa	45
Actividad antifúngica cualitativa	46
<b>Etapa II</b>	47
8.2. Estudio de <i>A. mollis</i> 2018	47
8.2.1. Rendimiento de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	47
8.2.2. Caracterización química cualitativa de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	48
8.2.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	49
Actividad antibacteriana cualitativa	49
Actividad antifúngica cualitativa	50
Actividad antibacteriana cuantitativa	50
<b>Etapa III</b>	51
8.3. Fraccionamiento biodirigido de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	51
8.3.1. Extracto hexánico (EH)	51
8.3.2. Extracto acetónico (EA)	59
8.3.3. Extracto metanólico (EM)	64
<b>9. DISCUSIÓN</b>	70
<b>Etapa I</b>	70

<b>9.1. Evaluaciones preliminares de los extractos de <i>F. petiolaris</i>, <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i></b>	70
<b>9.1.1. Rendimientos de los extractos de los extractos de <i>F. petiolaris</i>, <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i></b>	70
<b>9.1.2. Caracterización química cualitativa de <i>F. petiolaris</i>, <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i></b>	71
<b>9.1.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>F. petiolaris</i>, <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i></b>	72
<b>Actividad antibacteriana cualitativa</b>	72
<b>Actividad antifúngica cualitativa</b>	73
<b>Etapa II</b>	73
<b>9.2. Estudio de <i>A. mollis</i> 2018</b>	73
<b>9.2.1. Rendimiento y caracterización química cualitativa de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018</b>	73
<b>9.2.2. Caracterización química cualitativa de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018</b>	74
<b>9.2.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018</b>	74
<b>Actividad antibacteriana cualitativa</b>	74
<b>Actividad antifúngica cualitativa</b>	75
<b>Actividad antibacteriana cuantitativa</b>	75
<b>Etapa III</b>	76
<b>9.3. Fraccionamiento biodirigido de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018</b>	76
<b>9.3.1. Extracto hexánico (EH)</b>	76
<b>9.3.2. Extracto acetónico (EA)</b>	77
<b>9.3.3. Extracto metanólico (EM)</b>	78
<b>9.4 Discusión final</b>	80
<b>10. CONCLUSIONES</b>	82
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	83
<b>12. ANEXOS</b>	98

<b>Anexo I Detección cualitativa de grupos de metabolitos secundarios</b>	98
<b>Anexo II Técnica de difusión en agar o Kirby-Bauer (CLSI, 2018a)</b>	102
<b>Anexo III Técnica de inhibición del crecimiento radial de hongos (modificado de Wang y Ng, 2002).</b>	104
<b>Anexo IV Técnica de microdilución en caldo (CLSI, 2018b)</b>	105
<b>Anexo V Técnica de bioautografía (modificado de Rivas-Morales <i>et al.</i>, 2016)</b>	108
<b>Anexo VI Biorevelados de las fracciones del extracto hexánico</b>	109
<b>Anexo VII Biorevelados de las fracciones del extracto acetónico</b>	112
<b>Anexo VIII Biorevelados de las fracciones del extracto metanólico</b>	115

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detección cualitativa de grupos de metabolitos secundarios.	29
Tabla 2. Condiciones para el fraccionamiento biodirigido de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018.	35
Tabla 3. Fases móviles utilizadas para el biorevelado de las fracciones del extracto hexánico de <i>A. mollis</i> 2018.	37
Tabla 4. Fases móviles utilizadas para el biorevelado de las fracciones del extracto acetónico de <i>A. mollis</i> 2018.	39
Tabla 5. Fases móviles utilizadas para el biorevelado de las fracciones del extracto metanólico de <i>A. mollis</i> 2018.	41
Tabla 6. Rendimiento de los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos preliminares de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i> .	42
Tabla 7. Grupos de metabolitos secundarios detectados en los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos preliminares de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i> .	44
Tabla 8. Actividad antibacteriana cualitativa de extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos preliminares de <i>F. petiolaris</i> , <i>F. cotinifolia</i> y <i>A. mollis</i>	46
Tabla 9. Rendimiento de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de <i>A. mollis</i> 2018.	47
Tabla 10. Grupos de metabolitos secundarios detectados en los extractos hexánico, acetónico y metanólico de <i>A. mollis</i> 2018.	48
Tabla 11. Actividad antibacteriana cualitativa de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de <i>A. mollis</i> 2018.	49
Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos de <i>A. mollis</i> 2018	50
Tabla 13. Fraccionamiento del extracto hexánico de <i>A. mollis</i> 2018.	53

Tabla 14. Punto de fusión de los precipitados obtenidos en el fraccionamiento del extracto hexánico de <i>A. mollis</i> 2018.	54
Tabla 15. Actividad antibacteriana de las fracciones y precipitados del extracto hexánico de <i>A. mollis</i> 2018.	56
Tabla 16. Fraccionamiento del extracto acetónico de <i>A. mollis</i> 2018.	61
Tabla 17. Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto acetónico de <i>A. mollis</i> 2018.	62
Tabla 18. Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>A. mollis</i> 2018.	66
Tabla 19. Punto de fusión de los precipitados obtenidos en el fraccionamiento del extracto metanólico de <i>A. mollis</i> 2018.	67
Tabla 20. Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de <i>A. mollis</i> 2018.	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Morfología de *Ficus petiolaris*. (A) rama con siconos; (B) yema foliar terminal; (C) domacios de la hoja; (D) vista dorsal del sicono con pedúnculo largo; (E) ostiolo del sicono; (F) brácteas basales del sicono; (G) siconos pubescentes y con pedúnculos más cortos; (H) detalle de la pubescencia de la hoja sin domacios. Figura obtenida de Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012. 11
- Figura 2. Morfología de *Ficus cotinifolia*. (A) rama con siconos; (B) yema foliar terminal; (C) detalle de la venación de la hoja; (D) pubescencia de la hoja; (E) vista dorsal del sicono; (F) ostiolo del sicono; (G) brácteas basales del sicono. Figura obtenida de Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012. 14
- Figura 3. Morfología de *Acalypha sp.* (A) rama con inflorescencias estaminadas y pistiladas; (B) flor femenina. Figura obtenida de Martínez-Gordillo *et al.*, 2002. 16
- Figura 4. Estrategia metodológica general. 27
- Figura 5. Representación esquemática de la técnica de bioautografía. V: Vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sc: Sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 34
- Figura 6. Cromatoplasmas del extracto hexánico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) Vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizada en la bioautografía de *S. aureus*. Fase móvil Hexano/acetato de etilo en proporción 9:1. 51
- Figura 7. Cromatoplasmas de la fracción H7 y H13 del extracto hexánico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*. 57
- Figura 8. Cromatoplasmas de los precipitados PH3, PH8I, SCH9 y CH9 del extracto hexánico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC en la bioautografía de *S. aureus*. 58
- Figura 9. Cromatoplasmas del extracto acetónico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizada en la bioautografía de *S. aureus*. Fase móvil hexano/acetona en proporción 7:3. 59

Figura 10. Cromatoplasmas de las fracciones A8 y A27 del extracto acetónico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico y C) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*. 63

Figura 11. Cromatoplasmas del extracto metanólico de *A. mollis* 2018 eluidas con I) cloroformo/metanol en proporción 7:3 y II) acetato de etilo/metanol en proporción 1:1. Secciones 1-5 de reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*. 64

Figura 12. Cromatoplasmas de las fracciones M2, M14 y M21 del extracto metanólico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y B) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*. 69

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CBM</b>	Concentración Bactericida Mínima
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración Inhibitoria Media
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilina
<b>AMH</b>	Agar Mueller-Hinton
<b>APD</b>	Agar papa y dextrosa
<b>CMH</b>	Caldo Mueller-Hinton
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonia
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	Sulfato cérico
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Cloruro férrico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>TTC</b>	Cloruro de tetrazolio
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CP</b>	Cromatografía preparativa
<b>aff.</b>	Affinis
<b>EH</b>	Extracto haxánico
<b>EA</b>	Extracto acetónico
<b>EM</b>	Extracto metanólico

## RESUMEN

Las enfermedades infecciosas son de las afecciones más comunes en la piel, debido a que aquejan a personas de todas las edades. En la superficie cutánea existen microorganismos que pueden penetrar la piel por medio de laceraciones o heridas y así provocar enfermedades; los más comunes son los géneros *Staphylococcus*, *Candida* y *Trichophyton*. Las plantas medicinales son una alternativa o complemento de los tratamientos farmacológicos. Las barrancas del municipio de Tonalico, Estado de México, representan una zona de alta diversidad vegetal por lo que se está realizando un estudio etnomédico con la finalidad de documentar la flora medicinal empleada en la comunidad de San José de los Amates. Tomando como base esta información, el objetivo de este proyecto es contribuir al conocimiento de tres plantas medicinales utilizadas en dicha comunidad (*Ficus petiolaris*, *F. cotinifolia* y *Acalypha mollis*) mediante el estudio de la fitoquímica y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de cada planta.

Para cumplir este objetivo la estrategia metodológica se dividió en tres etapas. La primera consistió en la obtención de extractos de diferentes polaridades de las tres especies vegetales; éstos se caracterizaron cualitativamente por medio de pruebas coloridas para la detección de grupos de metabolitos secundarios como terpenos, alcaloides, fenoles, flavonoides, taninos y glicósidos. También se evaluó la actividad antimicrobiana cualitativa por medio del método de difusión en agar para seleccionar la especie vegetal con mayor potencial antimicrobiano. Los extractos de ambas especies de *Ficus* presentaron compuestos de tipo terpénico, flavonoides, cumarinas, taninos y glicósidos. *A. mollis* presentó además alcaloides y saponinas. Ningún extracto tiene actividad antifúngica. Todos los extractos de *A. mollis* mostraron ser activos en las dos especies de *Staphylococcus* que se evaluaron. Es por ello que se seleccionó a *A. mollis* para continuar con la investigación.

En la segunda etapa se realizó otra recolecta de *A. mollis* en el año 2018. Los extractos obtenidos a partir de este material vegetal también fueron caracterizados químicamente. Se evaluó la actividad antibacteriana cualitativa y cuantitativa por medio de los métodos de difusión en agar y microdulición en caldo, respectivamente. La presencia de los diferentes grupos de metabolitos en los extractos de *A. mollis* varió durante los dos años de colecta en cuanto a la presencia de alcaloides, terpenos y saponinas. El extracto metanólico fue el más activo al presentar las concentraciones mínimas inhibitorias más bajas en ambas especies de *Staphylococcus* (*S. aureus* 1.5 mg/mL; *S. epidermidis* 0.37 mg/mL).

En la tercera etapa se realizó el fraccionamiento biodirigido de los extractos de *A. mollis* con la finalidad de separar los metabolitos activos de los extractos. Para ello se realizaron cromatografías en columna abierta además de biorevelados utilizando la técnica de bioautografía. En el fraccionamiento del extracto hexánico se obtuvieron 20 fracciones, además de 6 precipitados y un sólido cristalino el cual tiene un punto de fusión 128 – 130 °C y es de naturaleza terpénica. El fraccionamiento del extracto acetónico permitió la obtención de 33 fracciones y un precipitado en la fracción A21, el cual tuvo un punto de fusión de 258 - 261 °C. Del fraccionamiento del extracto metanólico se agruparon 23 fracciones, así como 10 precipitados, tres de los cuales son sales. Con los biorevelados se demostró que dos de los extractos tienen fracciones bioactivas frente a *S. aureus*; sin embargo, las fracciones del extracto metanólico de *A. mollis* 2018 presentaron menor actividad antibacteriana en comparación con el extracto completo, lo que sugiere un efecto sinérgico.

## ABSTRACT

Infectious diseases are among the most common skin conditions, as they affect people of all ages. On the skin surface there are microorganisms that can penetrate the skin through lacerations or wounds and thus cause diseases, the most common of which are the genera *Staphylococcus*, *Candida*, and *Trichophyton*. Medicinal plants are an alternative or complement to pharmacological treatments.

The area of the canyons in Tonatico, Estado de México, represent an area of high plant diversity; therefore, an ethnobotanical study is being conducted to document the medicinal flora used in the community of San José de los Amates. Based on this information, the objective of this project is to contribute to the knowledge of three medicinal plants used in this community (*Ficus petiolaris*, *F. cotinifolia* and *Acalypha mollis*) through the study of phytochemistry and the evaluation of the antimicrobial activity of the extracts of each plant.

To meet this objective, the methodological strategy was divided into three stages. The first consisted of obtaining extracts of different polarities of the three plant species. These were qualitatively characterized by means of color tests for the detection of groups of secondary metabolites such as terpenes, alkaloids, phenols, flavonoids, tannins, and glycosides. Qualitative antimicrobial activity was evaluated by agar disk diffusion test to select the plant species with the highest antimicrobial potential. Extracts of both *Ficus* species presented terpenic compounds, flavonoids, coumarins, tannins and glycosides. *A. mollis* also contained alkaloids and saponins. None of the extracts showed antifungal activity. All *A. mollis* extracts were active in both *Staphylococcus* species evaluated. Therefore, *A. mollis* was selected for further research.

In the second stage, another collection of *A. mollis* was performed in 2018. The extracts obtained from this plant material were chemically characterized. The qualitative and quantitative antibacterial activity was evaluated by agar disk diffusion test and broth microdilution technique, respectively. The presence of the different groups of metabolites in the *A. mollis* extracts varied during the two years of collection in terms of the presence of alkaloids, terpenes and saponins. The methanolic extract was the most active, it had the lowest minimum inhibitory concentrations on both *Staphylococcus* species (*S. aureus* 1.5 mg/mL, *S. epidermidis* 0.37 mg/mL).

In the third stage, the bio-guided fractionation of *A. mollis* extracts was performed to separate the active metabolites in these extracts. For this purpose, were performed in open

column chromatography in addition to bioautography methods. In the fractionation of the hexane extract, 20 fractions were obtained. In addition, 6 precipitates and a crystalline solid which has a melting point of 128 - 130 °C and terpenic type were isolated. The fractionation of the acetonic extract yielded 33 fractions and a precipitate in fraction A21 which had a melting point of 258 - 261 °C. From the methanolic extract fractionation, 23 fractions were pooled, as well as 10 precipitates, three of which are salts. With the bioautography, it was demonstrated that two of the extracts have bioactive fractions against *S. aureus*; however, the fractions of the methanolic extract of *A. mollis* 2018 showed lower antibacterial activity compared to the whole extract, suggesting a synergistic effect.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), son enfermedades causadas por microorganismos patógenos como bacterias, hongos, virus y parásitos (World Health Organization, 2015). Se consideran un problema global, ya que cerca de un tercio de las muertes en todo el mundo son debido a estas afecciones (Liu *et al.*, 2017).

Las enfermedades infecciosas han sido un gran reto para la humanidad y tienen un antiguo registro de presencia cosmopolita (Frenk *et al.*, 2011). Evidencia de ello, es que a pesar de que los avances en las diferentes disciplinas científicas han permitido incrementar el conocimiento de los microorganismos causantes de dichas infecciones (Morens *et al.*, 2008), estos padecimientos siguen siendo una amenaza importante para la salud pública en el mundo, además de que provocan trastornos socioeconómicos de gran alcance (Smith *et al.*, 2019).

Las enfermedades infecciosas afectan a millones de personas y se sabe que la pobreza es un determinante clave en la incidencia de estos padecimientos (Hotez y Gurwith, 2011). Además, el requerimiento de antimicrobianos en hospitales de países en vías de desarrollo es 40% superior a la media que se requiere en países desarrollados, lo que ocasiona una crisis económica que está poniendo en riesgo el sistema de salud pública, esto principalmente por el uso indiscriminado de los antibióticos lo que conlleva a la generación y diseminación de resistencia a los mismos (Cisneros *et al.*, 2014).

Las enfermedades infecciosas son las afecciones más comunes que pueden presentarse en la piel (Verma, 2016), afectan a individuos de todas las edades (Tabassum y Hamdani, 2014) y son uno de los principales motivos de consulta médica, incluso en países como Estados Unidos, donde una de cada tres personas presenta infecciones cutáneas (Roye *et al.*, 2006).

La piel es la cubierta externa y el órgano más grande del cuerpo. Su principal función es la de actuar como una barrera protectora frente al medio ambiente (Jorcano, 2009; Tabassum y Hamdani, 2014). Está constituida por tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Jorcano, 2009).

En la superficie cutánea existe una microbiota que se modifica a lo largo de la vida del huésped, se puede dividir en: “residente o colonizante” y “transitoria o no colonizante”. La “residente” es constante y evita que proliferen otras especies patógenas protegiendo así la

piel. La “transitoria” aparece de forma pasajera y está formada por gérmenes patógenos (Corralo *et al.*, 2014).

Los microorganismos pueden penetrar en la piel, invadir la epidermis o las capas más profundas a través de laceraciones, heridas o por los folículos pilosos. Al penetrar los agentes patógenos en este órgano provocan infecciones, las cuales, si no se tratan correctamente, pueden diseminarse por todo el cuerpo (Ki y Rotstein, 2008; Tabassum y Hamdani, 2014) y causar enfermedades más serias como las bacteriemias, que es la presencia de bacterias en la sangre (Macedo *et al.*, 2006).

Los organismos típicos que colonizan la piel suelen ser bacterias grampositivas de los géneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Streptococcus*. Los estafilococos son los microorganismos más comunes de los humanos, ocasionalmente causan infecciones muy severas, se reconocen dos especies importantes (Madigan *et al.*, 2019):

A) *Staphylococcus epidermidis*, que es miembro de la microbiota normal de la piel (Seija, 2006) pero puede infectar prótesis ortopédicas o cardiovasculares, así como causar enfermedades en personas con afecciones inmunitarias (Martínez y Pérez, 2001).

B) *Staphylococcus aureus*, esta bacteria coloniza la piel y las mucosas de los seres humanos y varias especies animales, puede volverse patógena al penetrar la barrera cutánea o por la disminución de la inmunidad (Braz *et al.*, 2020), es muy importante debido a que infecta heridas quirúrgicas, además de que puede causar enfermedades como el síndrome de piel escaldada debido a la liberación de toxinas (Seija, 2006).

Aparte de enfermedades bacterianas, los humanos pueden sufrir de infecciones fúngicas, llamadas micosis, que a menudo afectan muchas regiones del cuerpo. Por ejemplo, algunas especies del género *Candida* son capaces de causar candidiasis, que es una enfermedad cosmopolita, puede ocurrir en la cavidad oral, la piel, el tracto vaginal u otras ubicaciones corporales (Pommerville, 2010). Aunque *C. albicans* posee la mayor capacidad patógena, la presión antifúngica causada por los antibióticos, ha favorecido que otras especies como *C. glabrata* y *C. tropicalis* se reporten en número creciente como agentes causantes de esta patología (Macola, 2001).

Otras enfermedades causadas por hongos que afectan la piel son llamadas dermatofitosis, comúnmente conocidas como infecciones de tiña. Los causantes de estas afecciones son

hongos filamentosos, pertenecientes a géneros como *Epidermophyton*, *Microsporium* y *Trichophyton* (Pommerville, 2010).

Las heridas e infecciones cutáneas se tratan médicamente de dos maneras: A) por la aplicación tópica o B) por vía sistémica de diversos fármacos. Sin embargo, se ha confirmado que muchos de estos alteran el metabolismo normal de la piel y causan diversos efectos secundarios (Javed, 2016).

Durante los últimos años, las plantas medicinales han atraído la atención de las comunidades farmacéuticas y científicas (Savoia, 2012) ya que se identifican como una posible fuente de agentes antimicrobianos (Liu *et al.*, 2017), debido a que presentan diversos compuestos llamados metabolitos secundarios como son flavonoides, terpenoides, glucósidos y alcaloides (Ullah *et al.*, 2016). Muchos de estos metabolitos poseen actividad antimicrobiana (Savoia, 2012) y son utilizados clínicamente (Farha y Brown, 2016).

Cientos de especies de plantas en todo el mundo se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de la piel causadas por bacterias, hongos y virus (Prashantkumar y Vidyasagar, 2008). En este sentido, las plantas presentan varias ventajas: suelen no tener efectos secundarios, tienen una mejor tolerancia por parte del paciente, son de bajo costo y de fácil acceso (Tabassum y Hamdani, 2014), ayudan al mecanismo de curación natural de la piel, sirven como agentes antimicrobianos y antiinflamatorios que estimulan la cicatrización y regeneración de heridas, sin la interferencia de patógenos externos dañinos (Javed, 2016).

México destaca entre los países con mayor número de plantas vasculares, con más de 23,522 especies (CONABIO, 2006); esta gran diversidad vegetal y una amplia riqueza cultural, han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales para tratar infecciones en las comunidades rurales (Sharma *et al.*, 2017). Además, actualmente se comercializan una amplia gama de fórmulas herbales utilizadas para el tratamiento de diversos padecimientos y que forman parte de la medicina tradicional mexicana (Ramírez-Hernández *et al.*, 2013).

A nivel de entidad, el Estado de México posee alta riqueza de especies debido a su posición geográfica, topografía, clima y vegetación, se caracteriza por la presencia de endemismos, es un importante centro de origen y diversidad de especies vegetales. Además, su amplia

riqueza cultural (Guadarrama-Martínez *et al.*, 2012), representa un banco de información significativo en el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades.

El municipio de Tonicato, Estado de México, forma parte de la cuenca del río Balsas y Amacuzac, se encuentra al sur del volcán Nevado de Toluca; las barrancas de Tonicato son zonas de difícil acceso, lo que las convirtió en un refugio para la flora (Luna-Céspedes, 2014). A pesar de ser una región con alta diversidad vegetal, cuenta con pocas investigaciones etnomédicas y farmacognósticas lo que lo convierte en un sitio ideal para la realización de nuevos estudios que se enfoquen en conocer y comprobar el uso etnomédico de las plantas que se utilizan en esta zona. Otro aspecto importante es que el servicio de salud en el municipio es limitado, ya que únicamente existen dos unidades médicas las cuales prestan servicios básicos. Además, las comunidades más alejadas presentan una gran dificultad para acceder a dichos servicios (Camacho y Hernández, 2009).

Luna-Céspedes (2014) realizó un estudio sobre la flora de las barrancas de Tonicato, Estado de México, en el cual refiere a *Ficus* (Moraceae) como uno de los géneros sobresalientes, por tener cinco o más especies presentes en esta zona. Este género destaca por la riqueza de especies que se pueden encontrar en nuestro país (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012). Luna-Céspedes (2014) también indica que, a nivel de familia, una de las más representadas en la zona de estudio es Euphorbiaceae; de las 19 especies que reporta, tres pertenecen al género *Acalypha*. Además, esta familia es la quinta más diversa a nivel nacional (Villaseñor, 2016).

Durante el 2017 y 2018 se realizó un estudio etnomédico en la comunidad de San José de los Amates en el municipio de Tonicato, Estado de México (León, en proceso). El cual se enfocó en la flora medicinal utilizada para el tratamiento de padecimientos cutáneos. En los resultados de dicho proyecto se encontró que algunas especies del género *Ficus* y del género *Acalypha* tienen importancia etnomédica en esa comunidad.

## 1.1. Descripción botánica de las especies

***Ficus petiolaris*** Kunt (THEPLANTLIST: kew-2811713.)

Datos taxonómicos (GBIF Secretariat, 2021b)

Reino: Plantae

Phylum o división: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Moraceae

Género: *Ficus* L.

Especie: *Ficus petiolaris* Kunth

Es una especie endémica de México (Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora y Zacatecas); se localiza en el bosque de coníferas, bosque de galería, bosque de *Quercus*, bosque espinoso, bosque tropical caducifolio, bosque tropical subcaducifolio, dunas costeras, matorral xerófilo, palmar y vegetación secundaria, desde el nivel del mar hasta los 2,100 m de altitud (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Árbol rupícola, de 8-30 m. Corteza que se desprende fácilmente en escamas pequeñas, amarilla o verde amarilla, exudado blanco o blanco cremoso, abundante, denso. Yema foliar terminal de (7-) 13-48 (-75) mm de largo × 3-10 mm de ancho en la base, pardo verdosa o parda, glabra o ligeramente pilosa. Entrenudos de 9-35 × 4-9.5 mm, amarillos a amarillo grisáceos, estriados, glabros o pubescentes, con exudado blanco, abundante, denso. Lámina foliar (3.5-) 6.3-16.5 × (2-) 6.5-14 (-18) cm, 0.8-1.5 veces más larga que ancha, ampliamente ovada a cordiforme, coriácea, base cordada, raramente subcordada truncada, ápice apiculado, haz glabro, envés glabro o con domacios en la base, 5-9 pares de venas laterales, inclinadas 45-60° con respecto a la costa, glabras o pubescentes, conspicuas en ambas caras; pecíolo de (20-) 61-140 (-170) × 1.2-2.3 mm, sulcado, glabro o pubescente. Siconos con pedúnculo (2.1-) 5.3-30 (-60) × 1.3- 2.2 mm, rollizo, verde oscuro, glabro o pubescente; brácteas basales conspicuas, de 2-3.8 × 2.8-4 mm, con el ápice redondeado, verde oscuras o pardas, glabras o pubescentes, persistentes; ostíolo circular, del mismo

color del receptáculo, 1-5 × 1-5 mm, aplanado a ligeramente convexo; sicono de 6-15 × 6-15 mm, esférico, con frecuencia ligeramente aplanado en el ápice, verde con máculas rojizas o verde oscuras (fases A-C) o verde amarillo, con máculas ligeramente más oscuras (fases D-E) en fresco, pardo en material seco, liso, glabro o pubescente, pared del higo de 0.4-0.7 mm de grosor (Figura 1) (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Nombres comunes: amate, amate amarillo, amate de corazón, ceiba amarilla, escalama, higo, higuera silvestre, palo blanco, pie de gavián, saiba amarilla (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Usos: *Ficus petiolaris* fue una de las varias especies del género utilizadas en la época prehispánica para la elaboración de papel “amate”. El látex de esta especie tiene propiedades medicinales antihelmínticas y los siconos son consumidos ocasionalmente por el hombre. Debido a su hermoso tronco amarillo y sus grandes hojas cordiformes, tiene un gran potencial como especie ornamental (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

En la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009d) se encontró que, en el Estado de México, esta especie se recomienda contra parásitos, herpes, tos, cálculos del bazo, para regular la menstruación y sanar fracturas. En Sonora se aconseja en casos de dolores de pecho, flemas, heridas y úlceras. En Morelos se emplea para atenuar la calentura y en el estado de Michoacán, contra la hepatitis.

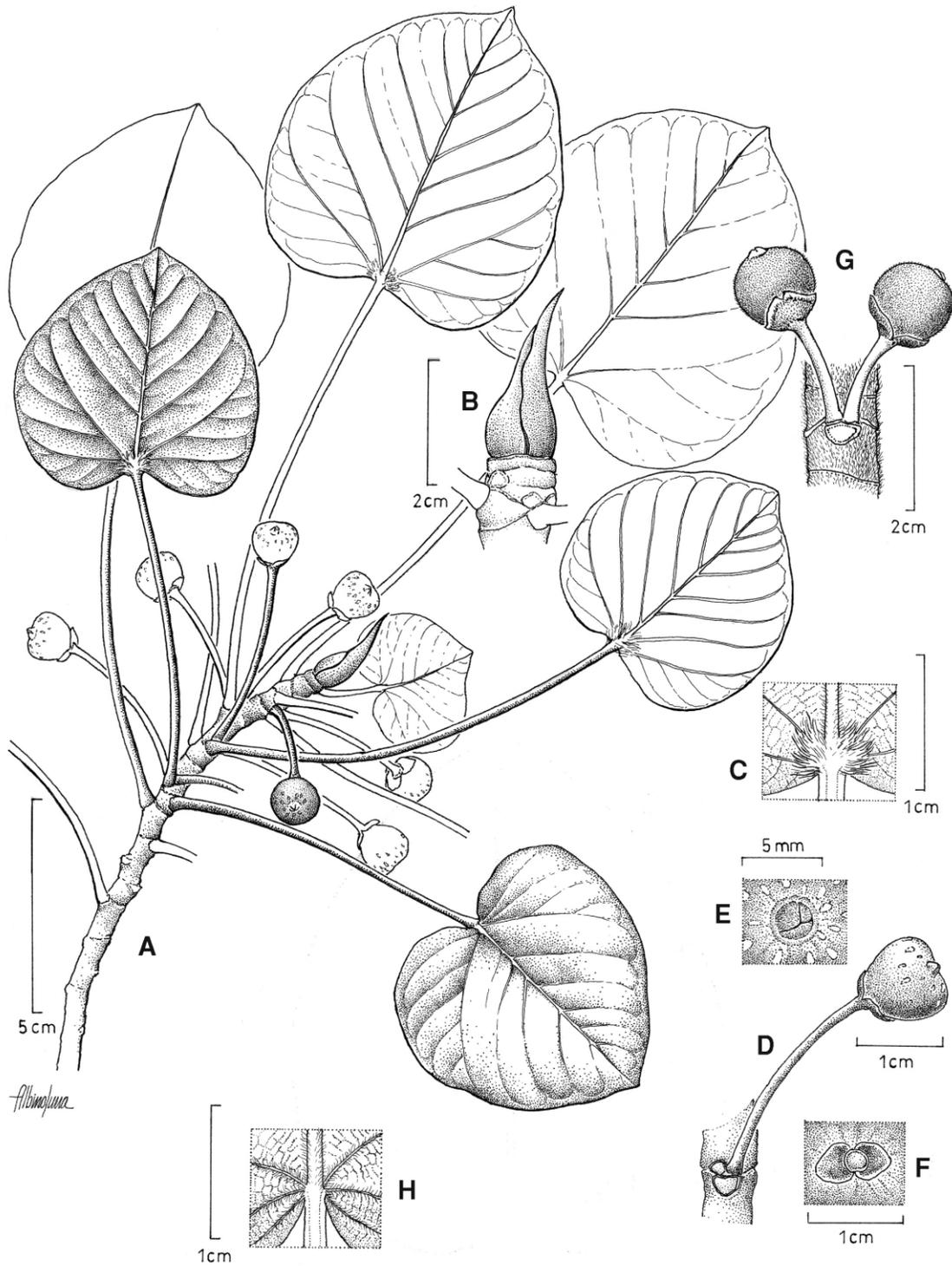


Figura 1. Morfología de *Ficus petiolaris*. (A) rama con siconos; (B) yema foliar terminal; (C) domacios de la hoja; (D) vista dorsal del sicono con pedúnculo largo; (E) ostiolo del sicono; (F) brácteas basales del sicono; (G) siconos pubescentes y con pedúnculos más cortos; (H) detalle de la pubescencia de la hoja sin domacios. Figura obtenida de Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012.

***Ficus cotinifolia*** Kunt (THEPLANTLIST: kew-2810059)

Datos taxonómicos (GBIF Secretariat, 2021a)

Reino: Plantae

Phylum o división: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Moraceae

Género: *Ficus* L.

Especie: *Ficus cotinifolia* Kunth

*Ficus cotinifolia* se distribuye en México (Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas) y Centroamérica (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras). En México se le encuentra en el bosque de coníferas, bosque de galería, bosque de *Quercus*, bosque espinoso, bosque tropical subcaducifolio, bosque tropical caducifolio, duna costera, manglar, matorral xerófilo, palmar y vegetación secundaria, especialmente a altitudes menores de 1,500 m.s.n.m., aunque puede alcanzar la cota de los 2,000 m (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Árbol hemiepifítico, estrangulador o con mayor frecuencia rupícola, de 3-20 m. Corteza gris, pardo gris o pardo pálida a oscura, con exudado blanco, abundante, denso. Yema foliar terminal de 3.5-16 mm de largo × 2-7 (-10) mm de ancho en la base, parda o blanca, con pubescencia muy densa, en ocasiones glabrescente. Entrenudos glabros o escasamente pubescentes, con exudado blanco, abundante, denso. Lámina foliar de 3-14 (-17) × 2.3-12 cm, 1.1-2.1 veces más larga que ancha, elíptica, ampliamente elíptica, ovada, obovada o raramente rómbica, coriácea, base redondeada, obtusa o cuneada, ápice redondeado, obtuso o agudo, en ocasiones mucronado, haz y envés glabros o pubescentes, 5-8 pares de venas laterales, inclinadas de 35-50° con respecto a la costa, glabras o pubescentes, las venas conspicuas en ambas caras, el primer par se une con el siguiente hacía un tercio

o a la mitad de la lámina; pecíolo de 8-76 mm × 0.8-2 mm, sulcado, glabro o pubescente. Siconos sésiles; brácteas basales inconspicuas o cubriendo el receptáculo hasta en 2/3 de su longitud, de 2-6.5 mm × 2-6 mm, ápice agudo o redondeado, amarillas o pardas, densamente pubescentes, especialmente en la cara interna, persistentes; ostíolo de 0.7-3.4 mm de diámetro, circular, aplanado a ligeramente crateriforme, con un engrosamiento anular; sicono de 3-14 × 4-13 mm, esférico, con el ápice ligeramente aplanado, verde, amarillo o verde amarillo con puntos rojos en fresco (fases A-C) o rojos (fases D-E), amarillo o pardo pálido, con máculas negras, pardo oscuras o pálidas en seco, liso, glabro, en ocasiones ligeramente pubescente (fase B-C), pared del higo de 0.1-0.3 mm de grosor (Figura 2) (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Nombres comunes: álamo, amate, amate blanco, amate de zorra, amate gris, amate negro, amate prieto, amezquite, amezquite blanco, árbol de leche, camechín, camechina, camuchina, capulín, ceiba negra, ceibo, chipil, cobó, chalata, higo, higo de zorro, higuera negra, higerilla, higerón, saiba, saiba blanca, saiba guicha, zalate (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Usos: El sicono es comestible y el látex tiene propiedades medicinales (contra asma y parásitos intestinales). Esta especie puede encontrarse frecuentemente como “cerca viva” o favorecer su presencia en pasturas del trópico húmedo para dar sombra al ganado o servir como forraje. Su corteza fue usada en tiempos prehispánicos para la elaboración de papel “amate”, una actividad que aún persiste en el estado de Puebla (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Según la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional (2009c) esta planta se emplea en el estado de Guerrero para tratar la inflamación del bazo y del abdomen. En Morelos, para el paludismo y en Yucatán para tratar la bronquitis.

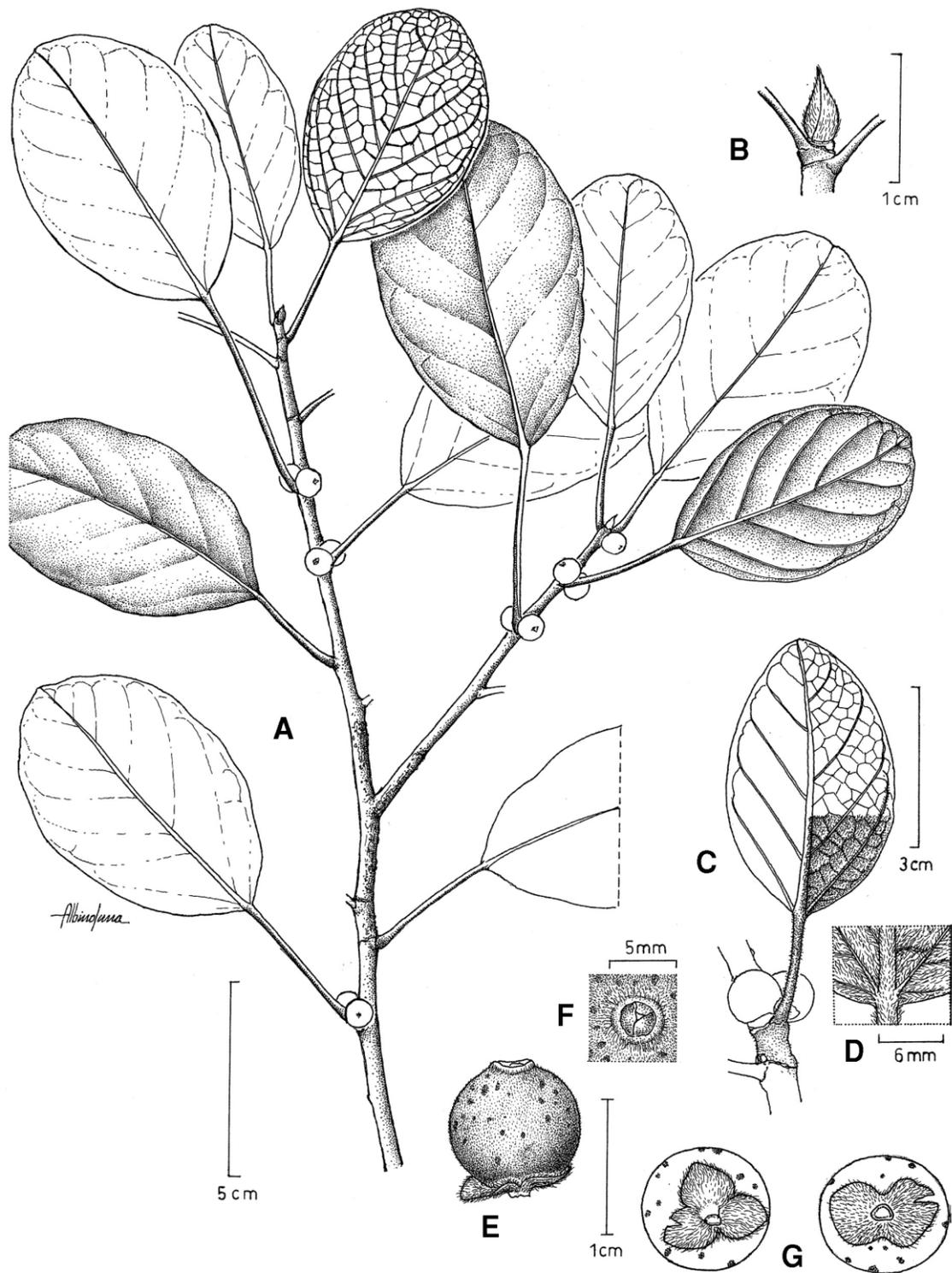


Figura 2. Morfología de *Ficus cotinifolia*. (A) rama con siconos; (B) yema foliar terminal; (C) detalle de la venación de la hoja; (D) pubescencia de la hoja; (E) vista dorsal del sicono; (F) ostiolo del sicono; (G) brácteas basales del sicono. Figura obtenida de Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012.

***Acalypha mollis*** Kunt (THEPLANTLIST: kew-900)

Datos taxonómicos (Departamento de Botánica, 2014)

Reino: Plantae

Phylum o división: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Acalypha* L.

Especie: *Acalypha mollis*

Se distribuye desde el centro y sur de México hasta Guatemala en bosques de *Quercus* y *Cupressus* en alturas de 2250-2500 msnm. Arbusto hasta de 2 m de alto, tallos con pubescencia; peciolo de 1 a 5 cm de largo, láminas generalmente de 5 a 11 cm de largo por 3 a 5 cm de ancho, con el borde aserrado; inflorescencia en forma de espigas axilares y terminales, las masculinas axilares en la parte inferior, solitarias, densas, de 3 a 10 cm de largo, por 2 a 3 mm de grueso, las femeninas terminales o axilares en la parte superior, solitarias o en pares, de 1 a 4 cm de largo por alrededor de 0.5 de ancho; fruto pubescente con semillas de 1.5 mm de largo, amarillentas y café-cobrizas (Universidad Autónoma de Querétaro, sf.) (Figura 3).



Figura 3. Morfología de *Acalypha* sp. (A) rama con inflorescencias estaminadas y pistiladas; (B) flor femenina. Figura obtenida de Martínez-Gordillo *et al.*, 2002.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Existe una alta incidencia y permanencia de enfermedades infecciosas en la piel, esto es debido a la prescripción y administración inadecuada de los antimicrobianos, lo cual tiene como consecuencia la aparición de resistencia por parte de los microorganismos causantes de infecciones lo que ocasiona que dichos medicamentos sean cada vez menos eficaces. Muchos de los tratamientos farmacológicos también pueden tener diversos efectos secundarios que llegan a ser contraproducentes. Lo anterior, representa una problemática importante para la sociedad hoy en día. Esto nos conduce a investigar alternativas terapéuticas de fuentes naturales como lo son las plantas medicinales; con la finalidad de obtener moléculas o fitofármacos que tengan potencial antimicrobiano que puedan sustituir o coadyuvar a los tratamientos farmacológicos.

Es importante también estudiar a mayor profundidad los recursos naturales de nuestro país, especialmente en zonas con una gran diversidad de plantas que cuenten con pocas investigaciones o cerca de comunidades con difícil acceso o desabasto de medicamentos. Ejemplo de lo anterior es la comunidad de San José de los Amantes en el municipio de Tonatico en el Estado de México, donde las especies *Ficus petiolaris*, *Ficus cotinifolia* y *Acalypha mollis* son de importancia etnomédica. A pesar de que no se han encontrado reportes en cuanto a la composición química y las actividades biológicas de estas plantas, se ha demostrado que otras especies de estos géneros presentan moléculas bioactivas como la taxifolina, el ácido gálico y el kaempferol que inhiben el crecimiento de microorganismos que causan infecciones cutáneas.

## 3. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Los extractos de las especies *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* colectadas en las barrancas del municipio de Tonatico, Estado de México tendrán compuestos que presentan actividad antimicrobiana en cepas de importancia dermatológica?

## 4. HIPÓTESIS

En la comunidad San José de los Amates se utilizan especies de los géneros *Ficus* y *Acalypha* para el tratamiento de infecciones cutáneas, se ha demostrado que algunas especies de estos géneros contienen con metabolitos secundarios actividad antimicrobiana. Por lo tanto, se espera que los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*, colectadas en las barrancas del municipio de Tonicato, Estado de México también posean compuestos activos contra cepas patógenas de importancia dermatológica.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de las plantas medicinales utilizadas en nuestro país mediante el estudio de la fitoquímica y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Ficus petiolaris* Kunt, *Ficus cotinifolia* Kunt y *Acalypha mollis* Kunt utilizadas en la comunidad de San José de los Amates en el municipio de Tonicato, Estado de México.

### 5.2. Objetivos particulares

- Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de diferentes polaridades de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* por medio de reacciones coloridas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana cualitativa de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* frente a cepas microbianas que causan infecciones cutáneas: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *C. glabrata* y *T. mentagrophytes*.
- Determinar la actividad antibacteriana cualitativa y cuantitativa de los extractos de *A. mollis* en *S. aureus* y *S. epidermidis*.
- Estudiar la fitoquímica de los extractos de *A. mollis* mediante un fraccionamiento biodirigido con base en su actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

## 6. ANTECEDENTES

Durante el 2017 y 2018 se realizó un estudio etnomédico en la comunidad de San José de los Amates en el municipio de Tonatico, Estado de México (León, en proceso), el cual se enfoca en la flora medicinal de la localidad. Tomando en cuenta lo anterior, para el presente proyecto se seleccionaron tres especies que son de importancia para el tratamiento de afecciones cutáneas en dicha región: *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*. Cabe resaltar que hasta la fecha no hay estudios en cuanto a la composición química y las actividades antimicrobianas de estas plantas, por lo que a continuación se presentan antecedentes sobre la etnobotánica, la composición química y las propiedades biológicas de ambos géneros.

### 6.1. Género *Ficus* L.

El género *Ficus* pertenece a la familia Moraceae, se estima que en todo el mundo existen más de 750 especies, de las cuales 22 son reconocidas para México (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Muchas especies del género *Ficus* se utilizan como alimento y en la medicina tradicional. El uso de sus especies se originó en el Medio Oriente y es en esta área donde se sigue utilizando ampliamente (Lansky *et al.*, 2008).

#### 6.1.1. Antecedentes etnobotánicos

Betti en el 2004 reporta que en Camerún la decocción del tallo de *F. mucoso* Welw. ex Ficalho es utilizada como pasta para dolor de dientes y se bebe para tratar la ictericia.

Tabassum y Hamdani en el 2014 describen el uso de tres especies de *Ficus*. Mencionan que, en algunas zonas rurales de Irán, utilizan el látex de *F. carica* L. como un método tradicional para el tratamiento de las verrugas. El polvo de la corteza de *F. racemosa* se emplea externamente en el caso de granos, picazones y sarna. El polvo de la corteza de *F. bengalensis* también se aplica externamente para curar la sarna.

Ahmed y Urooj (2011) describen los usos tradicionales de *F. racemosa* L. en India. Explican que el látex se aplica en forúnculos y hemorroides, o lo beben para curar el dolor de estómago y el cólera, además se utiliza como adhesivo. El fruto es un remedio para la obstrucción visceral, la diarrea y el estreñimiento. Se hace un baño con el fruto y la corteza para curar la lepra. La aplicación tópica de la savia de la raíz se utiliza contra paperas y

otras inflamaciones glandulares. La decocción de las hojas se emplea como ducha en la dismenorrea y para lavar heridas y úlceras. La infusión de la corteza es usada para tratar heridas y quemaduras.

### **6.1.2. Antecedentes fitoquímicos y de actividad biológica**

Kuete y colaboradores en el 2008 evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *F. chlamydocarpa* Mildbr. & Burret, *F. cordata* Thunb y la mezcla de los dos extractos. Estos autores reportan que el extracto etanólico de *F. cordata* fue el más activo en la mayoría de los organismos analizados. En *S. aureus* las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos crudos oscilaron entre 78.12 y 312. 50 µg/mL. En este trabajo no se aislaron compuestos químicos.

Gaire y colaboradores en el 2011 realizaron un análisis fitoquímico cualitativo de algunos extractos hexánico, cloroformico y metanólico de la corteza del tallo de *F. auriculata* Lour reportaron la presencia de alcaloides, carbohidratos, saponinas, glucósidos, fitoesteroles, resinas, fenoles, taninos, diterpenos, flavonoides, proteínas y aminoácidos. También evaluaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico, utilizando 1 mg de extracto reportaron que la mayor inhibición fue en *Escherichia coli* con 4.5 mm de zona inhibición. Mientras que para *S. aureus* el extracto hexánico fue más efectivo con halos de inhibición de 7.8 mm.

Wang y colaboradores en el 2014, estudiaron el extracto metanólico de tallos de *F. tsiangii* Merr. ex Corner. Aislaron treinta y cuatro compuestos, que incluyen: diez cumarinas, trece flavonoides, un lignano y siete triterpenos.

### **6.1.3. Compuestos químicos con actividad antimicrobiana**

Baumgartner y colaboradores (1990) evaluaron la actividad antimicrobiana de los alcaloides antofina y ficuseptina aislados de *F. septica* Burm.f., reportando que ambos mostraron actividad en *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* y *Penicilium oxalicum*; con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 1 y 10 µg/mL.

Kuete y colaboradores en el 2009 aislaron de *F. ovata* Vahl los siguientes compuestos: acetato de taraxerilo (terpeno); la 2-hidroxi isoprunitina (terpeno), la 6,7-(2-isopropenil furo)-5,2',4'-isoflavona, la cajanina (isoflavonas) y el ácido protocatéquico (fenol). Estos compuestos presentaron una CMI de entre 10 y 312 µg/mL en algunas de las especies

microbianas que evaluaron *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *C. albicans* y *Microsporum audouinii*.

Ao y colaboradores en el 2009 reportan que el alto contenido catecol en *F. microcarpa* L.F. podría contribuir a sus propiedades antimicrobianas. Kocaçalışkan y colaboradores en el 2006 evaluaron la actividad antimicrobiana del catecol. Este compuesto presentó actividad contra *Pseudomona putida*, *Pseudomona pyocyanea*, *Corynebacterium xerosis*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium italicum* en el rango de concentraciones de 5–10 mM.

Alqasoumi y colaboradores (2014) realizaron un estudio fitoquímico de las partes aéreas de *F. palmata* Forssk. Gracias al fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico aislaron e identificaron compuestos como el acetato de germanicol, el ácido vanílico, así como varias furanocumarinas como el psoraleno, el bergapteno y el *trans*-psoralenósido.

Fongang y colaboradores en 2015 mencionan que algunos flavonoides como la taxifolina, conrauflavonol y shuterina aislados en *F. thonningii* Blume presentaron CMI de entre 0.63 y 1.25 mg/mL en *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*.

#### **6.1.4. Antecedentes en México**

En la biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009c,d), se menciona que la especie *F. cotinifolia*, es utilizada en algunos estados, por ejemplo, en Guerrero se emplea el látex en para desinflamar el bazo y el abdomen. En Morelos el látex es utilizado contra el paludismo y en Yucatán tratan la bronquitis tomando una infusión de las hojas. Por otro lado, la especie *F. petiolaris* es utilizada en el Estado de México contra parásitos intestinales, herpes, tos, cálculos del bazo, para regular la menstruación y sanar fracturas, en Sonora se aconseja en casos de dolores de pecho, flemas, heridas y úlceras, en Morelos se emplea para la calentura y en Michoacán contra la hepatitis.

González-Castañeda y colaboradores (2010) mencionan que en la provincia geográfica de la depresión del Balsas consumen los frutos de *F. cotinifolia* además de utilizar su madera para postes.

Ibarra-Manríquez *et al.*, (2012) describen que la especie *F. cotinifolia* puede encontrarse frecuentemente como “cerca viva”, además en el Estado de Puebla la corteza es usada para la elaboración de papel “amate”. Por otro lado, mencionan que el látex de la especie

*F. petiolaris* tiene propiedades medicinales antihelmínticas y los siconos son consumidos ocasionalmente por el hombre y además tiene un gran potencial como especie ornamental.

## **6.2. Género *Acalypha* L.**

Dentro de la familia Euphorbiaceae, el género *Acalypha* es el cuarto más diverso con una amplia distribución en ambos hemisferios; principalmente en América tropical (Seebaluck *et al.*, 2015). Cuenta con aproximadamente 450 a 570 especies, de las cuales 108 están reportadas para México (Villaseñor, 2016).

### **6.2.1. Antecedentes etnobotánicos**

En todo el mundo, existen antecedentes etnobotánicos de los usos de algunas especies del género *Acalypha*.

Schindler en 1939 (citado en Adesina *et al.*, 2000) mencionan que, en Alemania, la decocción de las hojas de *A. hispida* Burm.f. se usa en el tratamiento de heridas, úlceras, abscesos, además de que hacen compresas para curar la lepra.

Oliver en 1959 (citado en Adesina *et al.*, 2000) reporta que en Nigeria trituran las hojas de *A. wilkesiana* Müll.Arg.; el jugo se usa para tratar la pitiriasis versicolor, tiña y otras infecciones similares de la piel.

Schmelzer y Gurib-Fakim en el 2008 describen los usos de algunas especies de *Acalypha* en el continente africano. Por ejemplo, las hojas machacadas de *A. ciliata* Forssk se aplican para tratar llagas, la infusión se bebe para la esquistosomiasis, además de que la consumen como verdura. En el caso de *A. fruticosa* Forssk, mencionan que beben la decocción de las raíces para tratar las convulsiones, fiebre, resfriados y úlceras causadas por enfermedades venéreas, la Infusión contra la tosferina, el jugo de las hojas machacadas se aplica como gotas para infecciones de ojos. La decocción de las raíces de *A. indica* L. se bebe para el tratamiento contra gusanos intestinales, dolores de estómago y también como laxante. El polvo de las hojas se aplica en heridas infestadas de gusanos, el jugo de las hojas trituradas se mezcla con sal y se utiliza contra la sarna y otros problemas de la piel. La decocción de *A. ornata* se bebe y se usa como baño para tratar lepra y dolores menstruales. El agua de las hojas remojadas se emplea como baños para niños con sarna. Además de que las hojas son cocinadas y consumidas con arroz y maíz.

Subbarayan y colaboradores en el 2010 describen algunos usos de *A. fruticosa*. En Yemen, las hojas y los tallos se utilizan para tratar enfermedades de la piel, malaria y heridas. En Tanzania, se emplea para combatir infecciones por hongos y se bebe una decocción de las hojas para tratar la epilepsia. La pasta de las hojas se aplica para afecciones como sarna y llagas, además los tallos molidos en agua se aplican a heridas de animales.

Emeka y colaboradores en el 2012 mencionan que en Nigeria se utiliza la decocción de la parte aérea de *A. ornata* Hochst. ex A.Rich. en el tratamiento de niños que tienen infecciones en la piel causadas por bacterias y hongos.

### **6.2.2. Antecedentes fitoquímicos y de actividad biológica**

Adesina y colaboradores (2000) evaluaron la actividad antimicrobiana de tres especies de *Acalypha* (*A. ciliata*, *A. indica* y *A. hispida*) así como tres variedades de *A. wilkesiana*. Reportaron halos de inhibición entre 9 y 18.5 mm en *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *C. pseudotropicalis*. Realizaron un fraccionamiento de los extractos etanólicos de las hojas de *A. hispida* y *A. wilkesiana*, e informan que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana son el ácido gálico, la corilagina y la geraniina. Además, de que lograron aislar otros flavonoides como la quercetina y el kaempferol.

Anbukkarasi en el 2012 evaluó el extracto metanólico de *A. indica* frente a cepas de importancia clínica, menciona que una concentración de 125 µg de extracto crudo inhibe completamente el crecimiento de células bacterianas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *S. aureus*.

Din y colaboradores en el 2013 evaluaron la actividad antimicrobiana de las fracciones del extracto etanólico de la parte aérea de *A. wilkesiana* var. Macafean. Estos autores reportan que los elagitaninos inhiben el crecimiento de *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 11632 y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA).

Noumedem y colaboradores (2013). Determinaron la presencia de diferentes grupos de metabolitos mediante reacciones coloridas del extracto metanólico de las hojas de *A. manniana* Müll.Arg. También evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto en nueve especies bacterianas y cuatro dermatofitos, entre los que destacan *S. aureus*, *T. mentagrophytes* y *T. terrestre*. Realizaron particiones del extracto metanólico con diferentes solventes. Sus resultados indican que *A. manniana* contiene alcaloides, taninos, antocianos, flavonoides, fenoles y esteroides. Además, el extracto crudo, así como la

partición de hexano, de acetato de etilo y las fracciones residuales presentaron actividad antibacteriana y antidermatofítica reportando CMI entre 0.12-2.04 mg/mL.

Fawzy y colaboradores en el 2017 estudiaron la especie *A. fruticosa*. Realizaron una columna cromatográfica del extracto metanólico. Los compuestos que lograron purificar fueron analizados por medio de espectroscopía de masas y resonancia magnética, llegaron a la conclusión de que *A. fruticosa* contiene como metabolitos principales el glucósido de la 2-metil-5,7-dihidroxicromona, la acalifina, la apigenina y el kaempferol.

Oyedemi y colaboradores en el 2018 evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *A. hispida* frente a *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *E. coli*, reportaron que el extracto presentó valores de CMI de 512, 256, >512, 512,  $\mu$ /mL respectivamente.

### **6.2.3. Compuestos químicos con actividad antimicrobiana**

Adesina y colaboradores en el año 2000, mencionan que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana de *A. hispida* y *A. wilkesinana* son el ácido gálico (fenol), la corilagina (tanino) y la geranina (tanino). Lamikanra, 1990 reporta que el ácido gálico fue activo en *S. aureus* y *E. coli* presentando halos de inhibición de 19 y 26 mm respectivamente. Burapadaja y Buncho en 1995 evaluaron la actividad antimicrobiana de la corilagina, en sus resultados informaron que este compuesto presentó CMI de entre 128 y 1024  $\mu$ g/mL en cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, MERSA, *K. pneumoniae*, *C. albicans*.

Gutierrez-Lugo y colaboradores en el 2002 reportan en *A. communis* Müll.Arg. la presencia de triterpenos tipo cicloartano como los ácidos 16 $\alpha$ -hidroxicólico, 15  $\alpha$ -hidroxicólico, 7 $\beta$ ,16  $\beta$ -dihidroxi-1,23-dideoxijésico, mencionan que estos tienen actividad en MERSA, *Enterococcus faecium*, *E. coli* y *B. subtilis*.

Anokwuru y colaboradores en el 2015 indican que los compuestos geranina (tanino), corilagina (tanino), ácido shikimico (fenol), ácido cuadrangulárico (triterpeno tipo cicloartano) aislados de *A. wilkesinana* presentan actividad en bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

#### 6.2.4. Antecedentes en México

Canales y colaboradores en el 2006, informan que, en el estado de Puebla, se utilizan fomentos de la parte aérea de *A. monostachya* Cav. para tratar granos, infecciones de heridas e inflamación.

En la biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009a,b), se mencionan usos de algunas especies del género *Acalypha* como, *A. adenostachya* Müll.Arg., esta especie es utilizada para tratar el cáncer de boca, de estómago, intestino y de piel, así como en dolores de estómago, además la infusión de la planta se recomienda para tratar grano infectados. *A. indica* en el estado de Puebla se emplea para lavar heridas.

Canales y colaboradores (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana de *A. monostachya*. Estos autores encontraron actividad frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Vibrio cholerae*, con CMI de entre 1 y 2 mg/mL. También detectaron actividad frente a hongos como *T. mentagrophytes*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium sporotrichum* reportando concentraciones inhibitorias medias (CI<sub>50</sub>) de 0.43, 1.2 y 8 mg/mL respectivamente.

Álvarez-Santos en el 2019 realizó un extracto metanólico crudo y dos particiones (hexánica y metanólica) de las partes aéreas de *A. monostachya*. Halló la presencia de fenoles, compuestos glicosilados, terpenos, esteroides y lactonas sesquiterpénicas en el extracto. El análisis por cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas de la fracción hexánica indica que el compuesto con mayor abundancia fue la  $\alpha$ -amirina (30.89%), seguida del escualeno (14.21%) y del ácido palmítico (3.85%).

De los antecedentes registrados para los géneros *Ficus* y *Acalypha*, es notoria la falta de estudios químicos y de actividad antimicrobiana de las especies *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* por lo que, en el presente trabajo se decidió estudiar la fitoquímica y la actividad antimicrobiana de estas tres especies vegetales.

## 7. ESTRATEGÍA METODOLÓGICA

En los laboratorios de Fitoquímica y Botánica, junto con el Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, se está realizando una investigación integral basada en la etnomedicina de las plantas utilizadas para el tratamiento de afecciones cutáneas en la comunidad de San José de los Amates en el municipio de Tonatico, Estado de México. De las especies utilizadas en dicha localidad. Para este estudio se seleccionaron las especies *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*.

La estrategia metodológica se dividió en tres etapas (Figura 4) La primera (sección 7.1) consistió en la caracterización cualitativa de los extractos de las tres especies seleccionadas. De estas se continuó trabajando con *A. mollis*, ya que presentó mayor actividad antimicrobiana. En la segunda etapa (sección 7.2) se realizó una recolecta de *A. mollis* para llevar a cabo las caracterizaciones cualitativas y evaluaciones de la actividad antibacteriana y antifúngica de sus extractos. Por último, en la tercera etapa (sección 7.3) se realizó la separación biodirigida de cada uno de los extractos de *A. mollis* con la finalidad de caracterizar hasta donde fue posible, las fracciones o los principios activos de la planta.

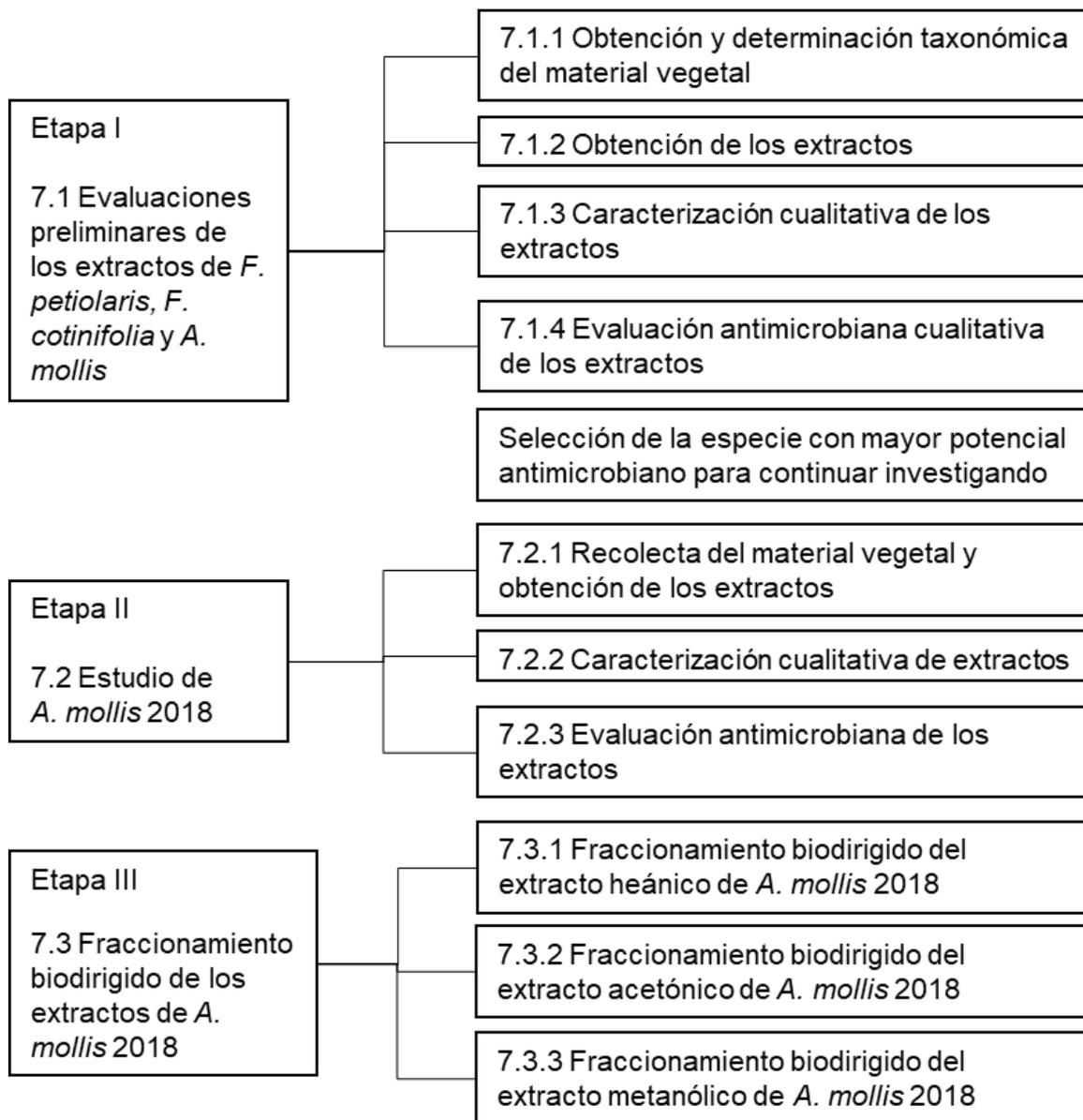


Figura 4. Estrategia metodológica general.

## **ETAPA I**

### **7.1. Evaluaciones preliminares de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis***

#### **7.1.1. Colecta y determinación taxonómica del material vegetal**

Las partes aéreas de las tres plantas se colectaron en las Barrancas de Tonatico, Estado de México en octubre del 2017. Posteriormente, ejemplares herborizados de cada especie se depositaron en el Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala para su identificación y registro. Los respaldos botánicos quedaron registrados con los siguientes números de registro:

- *F. petiolaris*: IZTA3312
- *F. cotinifolia*: IZTA3311
- *A. mollis*: IZTA3310

#### **7.1.2. Obtención de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis***

Las partes aéreas de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* se secaron a temperatura ambiente y se molieron. Una vez seco el material vegetal, se obtuvieron los extractos por medio de maceración en frío con solventes orgánicos en orden creciente de polaridad (hexano, acetona y metanol) a partir de 5 g de planta. Una vez obtenidos los extractos, se filtraron y concentraron en un rotavapor a presión reducida para obtener los sólidos totales. Posteriormente, se determinó su rendimiento por diferencia de peso (Benítez-Benítez *et al.*, 2020).

#### **7.1.3. Caracterización química cualitativa de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis***

La detección de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los nueve extractos se llevó a cabo por medio de reacciones coloridas (Tabla 1 y Anexo I) utilizando 1 mg/mL de extracto para cada prueba. También se utilizaron sustancias de referencia para comparar los resultados obtenidos.

Tabla 1. Detección cualitativa de grupos de metabolitos secundarios.

Grupo de metabolito	Método o agente cromógeno	Referencia
Alcaloides	Reactivo de Drangendorff	Domínguez, 1973
	Reactivo de Mayer	
Terpenos	Vainillina/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Wagner, 2001
	Liebermann-Burchard	Rivas-Morales <i>et al.</i> , 2016
Compuestos fenólicos generales	FeCl <sub>3</sub>	Rivas-Morales <i>et al.</i> , 2016
Flavonoides	NaOH	Rengifo-Penadillos, 2013
	Shinoda	Rivas-Morales <i>et al.</i> , 2016
Cumarinas	KOH y luz UV	Wagner, 2001
Taninos	FeCl <sub>3</sub> /solución de gelatina	Serrano-Parrales, 2013
Saponinas	Prueba de espuma	Domínguez, 1973
Glicósidos	Reactivo de Molisch	Foulger, 1931 y García-Bores <i>et al.</i> , 2020

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico. FeCl<sub>3</sub>: Cloruro férrico. NaOH: Hidróxido de sodio. KOH: Hidróxido de potasio. UV: Ultravioleta.

#### **7.1.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana cualitativa de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis***

Las evaluaciones microbiológicas se realizaron en las instalaciones del laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los microorganismos utilizados fueron donadas por este mismo laboratorio.

##### **Actividad antibacteriana cualitativa**

La evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC29213 y *S. epidermidis* ATCC12228 se realizó mediante el método de difusión en agar o Kirby-Baüer (CLSI, 2018b) empleando agar Mueller-Hinton (AMH). Se usaron sensidiscos de papel filtro estériles de 5 mm de diámetro, como tratamientos se impregnaron 2 mg de cada extracto, como control positivo se utilizaron 25 µg de cloranfenicol y como control negativo 10 µL del solvente apropiado. Se sembraron las placas con un hisopo estéril a partir de un inóculo de aproximadamente  $10 \times 10^8$  UFC/mL, posteriormente se colocaron los sensidiscos sobre las placas inoculadas. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas (Anexo II). Cada bioensayo se realizó por triplicado. En esta evaluación se miden los halos de inhibición de cada extracto y se reportan en milímetros (mm).

##### **Actividad antifúngica cualitativa**

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica en *C. albicans* ATCC17MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis* se realizó mediante el método de difusión en agar o Kirby-Baüer utilizando agar papa y dextrosa (APD) (CLSI, 2018b). Se usaron sensidiscos estériles, a los cuales se les impregnaron 2 mg de extracto, como control positivo se utilizaron 50 µg de nistatina y como control negativo 10 µL de solvente de cada extracto. Las placas se sembraron con ayuda de un hisopo estéril con un inóculo de aproximadamente  $10 \times 10^8$  UFC/mL y se incubaron a 37°C durante 24 horas, posteriormente se midió el halo de inhibición de los extractos y de los controles (positivo y negativo). Cada bioensayo se realizó por triplicado. En esta evaluación se reportan los halos de inhibición de cada extracto en mm ± la desviación estándar (Anexo II).

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica frente a *T. mentagrophytes* se realizó por medio de la técnica de inhibición del crecimiento radial (modificado de Wang y Ng,

2002). Se sembró el micelio del hongo en cajas Petri con APD, la placa se dejó a temperatura ambiente durante dos semanas para el desarrollo del micelio. Una vez que comenzó a crecer el hongo, se colocaron los sensidiscos impregnados con 2 mg de extracto. Como control positivo se utilizaron 10 µg de ketoconazol y como control negativo 10 µL de solvente de cada extracto. Cada bioensayo se realizó por triplicado. En este ensayo se reporta la inhibición del crecimiento radial del hongo (Anexo III).

## **ETAPA II**

### **7.2. Estudio de *A. mollis* 2018**

*A. mollis* fue la especie con mayor potencial antimicrobiano, por lo que esta especie se seleccionó para continuar con las siguientes etapas de este estudio.

#### **7.2.1. Recolecta del material vegetal y obtención de extractos de *A. mollis* 2018**

La parte aérea de *A. mollis* se recolectó en las Barrancas del municipio de Tonicaco, Estado de México en septiembre del 2018 y se puso a secar a temperatura ambiente. La obtención de los extractos se realizó a partir de 256.6 g de planta seca por medio de maceración en frío con solventes orgánicos en orden creciente de polaridad (hexano, acetona y metanol). Una vez obtenidos los extractos, se filtraron y concentraron en un rotavapor a presión reducida. Posteriormente, se determinó el rendimiento de los sólidos totales de cada extracto por diferencia de peso (Benítez-Benítez *et al.*, 2020).

#### **7.2.2. Caracterización química cualitativa de los extractos de *A. mollis* 2018**

La detección de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los tres extractos se realizó por medio de reacciones coloridas. Se utilizaron las mismas pruebas mencionadas anteriormente en la Etapa 7.1 sección 7.1.3.

#### **7.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *A. mollis* 2018**

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

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los extractos de *A. mollis* frente a *S. aureus* ATCC29213 y *S. epidermidis* ATCC12228 se realizó de la misma manera que fue descrita en la sección 7.1.4.

### **Evaluación de la actividad antifúngica cualitativa**

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica en *C. albicans* ATCC17MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis* así como en el hongo *T. mentagrophytes* se realizó conforme a lo descrito en la sección 7.1.4.

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

La evaluación de la actividad bacteriana cuantitativa de los extractos de *A. mollis* 2018 se realizó por medio de microdilución en caldo (CLSI, 2018a) en las especies bacterianas *S. aureus* ATCC29213 y *S. epidermidis* ATCC12228. Se prepararon soluciones stock de 3.0 mg/mL de cada extracto diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) y caldo Mueller-Hinton (CMH). Estas soluciones stock a su vez, se diluyeron en placas de 96 pozos estériles hasta tener las siguientes concentraciones de 1.5, 0.75, 0.375, 0.187 y 0.093 mg/mL. Los controles fueron los siguientes: a) controles de esterilidad, 1. CMH sin inóculo, 2. CMH sin inóculo y con solvente y 3. CMH con extracto, b) controles de crecimiento, 1. CMH con inóculo y 2. CMH con inóculo y solvente y c) control positivo de inhibición del crecimiento (CMH con inóculo y 5 µg/mL de cloranfenicol). Previo al experimento se preparó un inóculo que tenía una concentración bacteriana aproximadamente de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, este se diluyó en solución salina estéril al 0.9% hasta obtener una concentración final de alrededor  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se revelaron con cloruro de tetrazolio (TTC) para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) considerando la concentración más baja de extracto que inhibe el crecimiento de los microorganismos. Posteriormente, con el fin de determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM) que es la concentración mínima que mata el 99% del inóculo presente en el experimento se sembraron por dispersión las repeticiones de los pozos que no fueron bioreveladas con TTC en una placa de AMH, la cual se incubó durante 24 horas a 37°C (Anexo IV).

## ETAPA III

### 7.3. Fraccionamiento biodirigido de los extractos de *A. molis* 2018

#### Métodos cromatográficos

##### Bioautografía

La cromatografía en capa fina (CCF) unida a los bioensayos es una herramienta utilizada para la separación de compuestos con diversas actividades biológicas a partir de mezclas complejas (Darwish *et al.*, 2020). Así, la bioautografía un método de cribado antibacteriano comúnmente utilizados para la detección de metabolitos activos, puede combinarse con éxito con la técnica de CCF (Dehghan *et al.*, 2020) y brindarnos una identificación rápida de las bandas bioactivas en las sustancias presentes en los extractos vegetales. Para la visualización de crecimiento microbiano en las CCF se utilizan sales de tetrazolio, como el TTC, éstas son reducidas por las deshidrogenasas de los microorganismos vivos lo que cambia su coloración, así, las zonas blancas en la placa de CCF indican una actividad antimicrobiana, mientras que las regiones rosadas son fracciones sin actividad (Dewanjee *et al.*, 2015).

Para detectar qué bandas o fracciones son activas en una CCF se realizó una bioautografía de contacto de acuerdo con el método modificado de Rivas-Morales *et al.*, 2016. Para cada sustancia a evaluar se utilizó un cromatofolio o placa de aluminio cubierta con gel de sílice G60. Las placas cromatográficas se sembraron en forma de banda y se eluyeron con una fase móvil previamente seleccionada. Una vez que el cromatofolio estaba seco, se cortó de manera vertical con el fin de obtener secciones de 1 cm de ancho y se observan en UV a 254 y 366 nm. Posteriormente, las placas se revelaron con a) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para detectar la presencia de terpenos y b) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para compuestos orgánicos en general; c) la última placa se utilizó en el biorevelado frente a *S. aureus* ATCC29213.

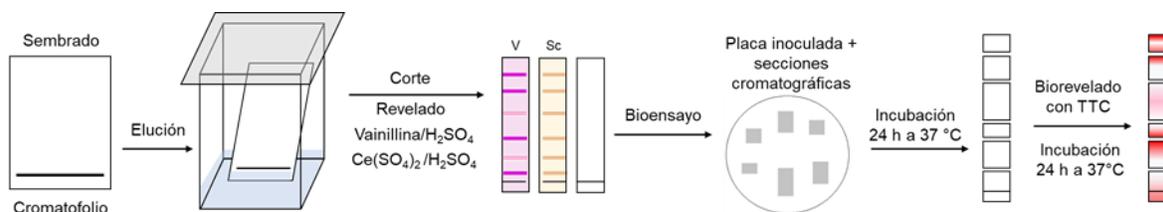


Figura 5. Representación esquemática de la técnica de bioautografía. V: Vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sc: Sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Para llevar a cabo el biorevelado la placa sin revelador químico se cortó en secciones, basadas en los cromatofolios que se usaron para determinar terpenos o compuestos orgánicos. Las secciones fueron colocadas en cajas con AMH previamente inoculadas con un hisopo a partir de un inóculo bacteriano de aproximadamente  $10 \times 10^8$  UFC/mL y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de este tiempo, las secciones de las placas se despegaron del agar y se asperjaron con TTC, posteriormente se incubaron durante 15-60 minutos con el fin de observar donde se presentó crecimiento (Figura 5 y Anexo V).

### Cromatografía en columna abierta

El fraccionamiento de los extractos se llevó a cabo por medio de cromatografía de adsorción en columna abierta (CC). Para esto, primero se pesó la cantidad de extracto a utilizar, estos se disolvieron en el solvente correspondiente a su polaridad y se preadsorbieron en celita. Se preparó una columna de vidrio que contenía sílica gel (G 60) y se utilizó una fase móvil en gradiente en orden creciente de polaridad como se describe en la Tabla 2.

Al eluir la CC se obtienen alícuotas las cuales se concentran en un rotavapor a presión reducida y se analizan por CCF, las placas cromatográficas se observaron con luz UV y se revelan químicamente con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, esto con el fin de agrupar las alícuotas similares en fracciones y así poder medir su rendimiento. Si se obtiene de alguna fracción algún sólido cristalino o un precipitado, estos se filtran y se determina su punto de fusión en un aparato Fisher-Johns.

Tabla 2. Condiciones para el fraccionamiento biodirigido de los extractos de *A. mollis* 2018.

Extracto	Hexánico	Acetónico	Metanólico
Fase móvil para biorevelado (CCF)	Hexano/AcoEt 9:1	Hex/acetona 7:3	Cloroformo/metanol 7:3 y AcoEt/MeOH 1:1
Fase móvil para CC	Hex Hex-AcoEt AcoEt-MeOH	Hex, Hex-acetona, acetona acetona- MeOH MeOH y H <sub>2</sub> O	AcoEt AcoEt-MeOH MeOH MeOH- H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O
Gramos de extracto utilizados en la CC	3.66	5.72	21.96
Tamaño de alícuotas (mL)	≈75	≈150	≈500

Hex: Hexano. AcoEt: Acetato de etilo. MeOH: Metanol. H<sub>2</sub>O: Agua.

### **7.3.1. Extracto hexánico (EH)**

#### **7.3.1.1. Biorevelado del EH**

El biorevelado del extracto hexánico (EH) de *A. mollis* 2018 se realizó según lo presentado en la Figura 5 y el anexo VII. Se utilizó un cromatofolio de aluminio cubierto con gel de sílice G60 de 3 cm de ancho por 10 cm de largo, la fase móvil fue de hexano/acetato de etilo en proporción 9:1. Las placas se revelaron con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### **7.3.1.2. Cromatografía en columna del EH**

Para el fraccionamiento del EH se usaron 3.66 g y una fase móvil en gradiente de hexano-acetato de etilo-metanol (Tabla 2). Se recuperaron alícuotas de ≈75 mL. Los sólidos obtenidos el fraccionamiento fueron filtrados y se comprobó su pureza por medio de CCF reveladas con luz UV a 254 y 366 nm, vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y/o sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se midió el punto de fusión de los sólidos obtenidos en las fracciones con un aparato Fisher-Johns.

En la fracción H9 obtenida en el fraccionamiento del EH se observó la presencia de sólidos cristalinos en forma de aguja (SCH9). Por CCF se comprobó que no estaban puros, basados en esto se decidió purificarlos en cromatoplasmas preparativas.

#### **Purificación del sólido cristalino de la fracción H9 (SCH9)**

Los cristales obtenidos en la fracción H9 (SCH9) se purificaron por medio de una cromatografía preparativa (CP) en placas de vidrio de 20 x 20 cm cubiertas de gel de sílice (G 60). Con el fin de aislar los compuestos y poder elucidar su estructura. Además, se determinó su actividad antimicrobiana. Previo a la cromatografía preparativa se evaluó la solubilidad de la fracción y se determinó la fase móvil adecuada que fue hexano/acetato de etilo 8:2. Para el revelado se observaron las placas en luz UV y las orillas se asperjaron con vainillina y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Se recuperaron los sólidos obtenidos y se midió su punto de fusión con un aparato Fisher-Johns.

#### **7.3.1.3. Biorevelado de fracciones del EH**

Debido a la contingencia sanitaria ocasionada por el virus SARS-CoV-2 para el biorevelado de las fracciones de la separación cromatográfica por CC del EH se decidió utilizar solo la mitad. El biorevelado de las fracciones y los precipitados obtenidos en el fraccionamiento

del EH se realizó como se muestra en la Figura 5 y el anexo VIII. Se utilizaron placas de aluminio cubiertas de gel de sílice (G 60) de 3 cm de ancho por 6 cm de largo. Las placas se revelaron con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las fases móviles utilizadas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Fases móviles utilizadas para el biorevelado de las fracciones del extracto haxánico de *A. mollis* 2018.

Fracción	Fase móvil
H1	•
H4	95:5 Hex/AcoEt
H7	9:1 Hex/AcoEt
H9	8:2 Hex/AcoEt
H11	8:2 Hex/AcoEt
H13	6:4 Hex/AcoEt
H14	6:4 Hex/AcoEt
H16	1:1 Hex/AcoEt
H18	100% AcoEt
H20	100% AcoEt
PH3	•
PH7	•
PH8I	•
PH8II	•
SCH9	•
CH	•

Hex: Hexano. AcoEt: Acetato de etilo. •: Placas sembradas por punteo y sin eluir.

## **7.3.2. Extracto acetónico (EA)**

### **7.3.2.1. Biorevelado del EA**

El biorevelado del extracto acetónico (EA) de *A. mollis* 2018 se realizó de acuerdo con la Figura 5 y el anexo VIII. Se utilizó un cromatofolio de aluminio cubierto con gel de sílice G60 de 3 cm de ancho por 10 cm de largo y una fase móvil de hexano/acetona en proporción 7:3, se observaron en luz UV y se revelaron con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **7.3.2.2 Cromatografía en columna del EA**

Para el fraccionamiento del EA por CC se utilizaron 5.72 g de extracto y una fase móvil en gradiente de hexano-acetona-metanol-agua (Tabla 2). Se recuperaron 194 alícuotas de ≈150 mL. El desarrollo de la columna se siguió por cromatografía en capa fina para unir las alícuotas con el mismo patrón y como reveladores, dependiendo del caso, se emplearon: luz UV, vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gracias a esto se reunieron 32 fracciones. Los sólidos o precipitados obtenidos en esta separación fueron filtrados y posteriormente se determinó el punto de fusión en un aparato Fisher-Johns.

### **7.3.2.3. Biorevelado de fracciones del EA**

Se siguió el mismo criterio y procedimientos experimentales mencionados en la sección 7.3.1 para las fracciones del fraccionamiento por CC del EA. Las fases móviles utilizadas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Fases móviles utilizadas para el bio-revelado de las fracciones del extracto acetónico de *A. mollis* 2018.

Fracción	Fase móvil
A2	98:2 Hexano/Acetona
A4	8:2 Hexano/Acetona
A5	8:2 Hexano/Acetona
A7	7:3 Hexano/Acetona
A8	6:4 Hexano/Acetona
A9	6:4 Hexano/Acetona
A12	1:1 Hexano/Acetona
A15	1:1 Hexano/Acetona
A18	1:1 Hexano/Acetona
A19	1:1 Hexano/Acetona
A22	100% Acetona
A23	100% Acetona
A25	9:1 Acetona/MeOH
A27	7:3 Acetona/MeOH
A29	6:4 Acetona/MeOH
A32	1:1 Acetona/MeOH

Hex: Hexano. MeOH: Metanol.

### **7.3.3. Extracto metanólico (EM)**

#### **7.3.3.1. Biorevelado del EM**

El biorevelado del extracto metanólico (EM) de *A. mollis* 2018 se realizó de acuerdo con lo descrito en la Figura 5 y el anexo VIII, fue necesario emplear dos placas con gel de sílice G60 de 3 cm de ancho por 10 cm de largo, debido a la diferencia de polaridad de los compuestos presentes en el extracto. La fase móvil utilizada para separar compuestos de menor polaridad fue cloroformo/metanol en proporción 7:3 y para los compuestos de mayor polaridad una mezcla de acetato de etilo/metanol en proporción 1:1. Las placas se revelaron con luz UV, posteriormente se cortaron de manera vertical y se revelaron con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Con base en las bandas observadas, los cromatofolios se cortaron en cinco secciones. Posteriormente las secciones sin revelador se utilizaron en la bioautografía de contacto de *S. aureus* y se revelaron con TTC.

#### **7.3.3.2. Cromatografía en columna del EM**

En el fraccionamiento del EM por CC se emplearon 21.96 g de extracto y una fase móvil en gradiente de acetato de etilo-metanol-agua (Tabla 2), se tomaron alícuotas de ≈500 mL y el desarrollo de la columna se monitoreo igual que las anteriores. Los sólidos obtenidos también se filtraron y se determinaron sus puntos de fusión.

#### **7.3.3.3. Biorevelado de fracciones del EM**

Al igual que en las secciones 7.3.1 y 7.3.2, la mitad de las fracciones del fraccionamiento por CC del EM se analizaron para determinar su actividad antibacteriana mediante el biorevelado, el cual se realizó como se muestra en la Figura 5 y el anexo VIII. Se utilizaron placas de aluminio cubiertas de gel de sílice (G 60) de 2 cm de ancho por 6 cm de largo. Las placas se observaron con luz UV y se revelaron sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las fases móviles utilizadas se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Fases móviles utilizadas para el biorevelado de las fracciones del extracto metanólico de *A. mollis* 2018.

Fracción	Fase móvil
M2	98:2 AcoEt/MeOH
M4	98:2 AcoEt/MeOH
M6	95:5 AcoEt/MeOH
M9	9:1 AcoEt/MeOH
M10	8:2 AcoEt/MeOH
M12	6:4 AcoEt/MeOH
M14	1:1 AcoEt/MeOH
M16	1:1 AcoEt/MeOH
M18	3:7 AcoEt/MeOH
M19	2:8 AcoEt/MeOH
M21	1:9 AcoEt/MeOH
M23	•

AcoEt: Acetato de etilo. MeOH: Metanol. •: Placa sembrada por punteo y sin eluir.

## 8. RESULTADOS

### ETAPA I

#### 8.1. Evaluaciones preliminares de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*

##### 8.1.1. Colecta del material vegetal

Las partes aéreas de las tres especies vegetales fueron colectadas en las barrancas del municipio de Tonicaco en octubre del 2017.

##### 8.1.2. Rendimiento de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*

En la Tabla 6 se presentan los rendimientos de los extractos preliminares de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* obtenidos a partir de 5 g de material seco. En las tres especies, los extractos metanólicos son los que tienen mayor rendimiento, en especial el obtenido de *A. mollis* (12.8%).

Tabla 6. Rendimiento de los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos preliminares de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*.

Extracto	Rendimiento					
	<i>F. petiolaris</i>		<i>F. cotinifolia</i>		<i>A. mollis</i>	
	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
EH	0.11	2.2	0.12	2.4	0.05	1
EA	0.1	2	0.12	2.4	0.09	1.8
EM	0.36	7.2	0.39	7.8	0.64	12.8

Rendimientos a partir de 5 g de planta seca. EH: extracto hexánico. EA: extracto acetónico. EM: extracto metanólico.

### 8.1.3. Caracterización química cualitativa de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*

La detección de los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos preliminares de las tres especies se realizó mediante pruebas coloridas. En la Tabla 7 se muestran los resultados de estas determinaciones.

Los EA de *F. cotinifolia* y *F. petiolaris* presentaron glicósidos, flavonoides, cumarinas. Además, fue común la reacción positiva a compuestos terpénicos en las dos especies de *Ficus* en los EA y EM. Finalmente, en la parte polar de ambas especies (EM) se detectó la presencia de compuestos fenólicos, taninos, cumarinas y glicósidos (Tabla 7).

*A. mollis* es la especie con una mayor diversidad en su composición química. El EM contenía casi todos grupos de metabolitos secundarios, teniendo resultados más intensos en las pruebas coloridas usadas para la detección de fenoles, taninos y glicósidos. El EA mostró la presencia de glicósidos, flavonoides (NaOH) y triterpenos, mientras que en el hexánico resultó positivo en la prueba con vainillina y en la de Lieberman-Burchard (Tabla 7).

Tabla 7. Grupos de metabolitos secundarios detectados en los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos preliminares de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*.

Grupo de metabolito	Especies vegetales								
	<i>F. petiolaris</i>			<i>F. cotinifolia</i>			<i>A. mollis</i>		
	EH	EA	EM	EH	EA	EM	EH	EA	EM
Alcaloides (Dragendorff)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Alcaloides (Mayer)	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Terpenos (Vainillina)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Triterpenos (Liebermann-Burchard)	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Fenoles (FeCl <sub>3</sub> )	-	-	+	-	-	+	-	-	++
Flavonoides (NaOH)	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Flavonoides (Shinoda)	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Cumarinas	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Taninos	-	-	+	-	-	+	-	-	++
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glicósidos	-	+	++	-	+	++	-	+	++

+: Reacción positiva. ++: Presencia del grupo de metabolito con reacción colorida más intensa.

-: Reacción negativa. EH: Extracto hexánico. EM: Extracto metanólico. EA: Extracto acetónico.

#### **8.1.4. Actividad antimicrobiana de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis***

##### **Actividad antibacteriana cualitativa**

Los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos preliminares de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* se presentan en la Tabla 7.

Los EA de *F. cotinifolia* y *F. petiolaris* presentaron halos de inhibición de 6 mm en ambas especies de *Staphylococcus*. Los EH de ambas especies vegetales fueron activos en *S. aureus* (halos de 6 mm) pero no en *S. epidermidis*. Los EM de ambas especies de *Ficus* no presentaron actividad antibacteriana (Tabla 8).

Con respecto a *A. mollis*, los tres extractos resultaron activos frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los halos de mayor tamaño en *S. aureus* fueron con el EH y en *S. epidermidis* con el EM (7.0 mm con ambos extractos) (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad antibacteriana cualitativa de extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos preliminares de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*.

Halos de inhibición (mm)			
Especies vegetales			
Sustancia a evaluar	Cepa de <i>S. aureus</i>		
	<i>F. petiolaris</i>	<i>F. cotinifolia</i>	<i>A. mollis</i>
EH	6.0±0.0	6.0±0.0	7.0±0.0
EA	6.0±0.0	6.0±0.0	6.67±0.58
EM	NA	NA	6.0±0.0
C+	17.14±4.56		
Cepa de <i>S. epidermidis</i>			
EH	NA	NA	6.0±0.0
EA	6.0±0.0	6.0±0.0	6.67±1.5
EM	NA	NA	7.0±0.0
C+	28.57±2.07		

Se muestra el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar de los halos de inhibición.

EH: Extracto hexánico. EA: Extracto acetónico. EM: Extracto metanólico. Control positivo: 25 µg/disco de cloranfenicol. NA: sin inhibición.

### Actividad antifúngica cualitativa

Las especies *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis* no presentaron actividad antifúngica frente a las especies de levaduras *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* ni en el hongo filamentoso *T. mentagrophytes*.

## ETAPA II

### 8.2. Estudio de *A. mollis* 2018

A partir de los resultados obtenidos en las evaluaciones preliminares de la actividad cualitativa se decidió seleccionar a la especie *A. mollis* para continuar con las etapas II y III (Secciones 7.2 y 7.3) debido a que todos los extractos fueron activos en ambas cepas bacterianas.

#### 8.2.1. Rendimiento de los extractos de *A. mollis* 2018

En la Tabla 9 se presentan los rendimientos obtenidos a partir de la colecta del 2018 de la especie *A. mollis*. El EM fue el que presentó mayor rendimiento (10.11%) y el menor fue el EH (1.82%). Estas proporciones coinciden con lo obtenido en los extractos preliminares de la primera etapa.

Tabla 9. Rendimiento de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *A. mollis* 2018.

Extracto	Rendimiento	
	(g)	(%)
EH	4.66	1.82
EA	6.72	2.62
EM	25.96	10.11

Los rendimientos de los extractos son a partir de 256.6 g de partes aéreas de planta seca. EH: Extracto hexánico. EA: Extracto acetónico. EM: Extracto metanólico.

### 8.2.2. Caracterización química cualitativa de los extractos de *A. mollis* 2018

En la Tabla 10 se observan tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de diferentes polaridades de *A. mollis* colectada en el 2018. El EM presentó en su mayoría compuestos fenólicos (flavonoides, fenoles y taninos), además de glicósidos, saponinas y triterpenos. El EA también resultó positivo para compuestos fenólicos, glicósidos y terpenos. Finalmente, en el EH solo se detectaron compuestos de tipo terpénico y esteroidal (vainillina y Lieberman-Burchard).

Tabla 10. Grupos de metabolitos secundarios detectados en los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *A. mollis* 2018.

Grupo de metabolito	Extracto		
	EH	EA	EM
Alcaloides (Dragendorff)	-	+	+
Alcaloides (Mayer)	-	-	-
Terpenos (Vainillina)	++	+	-
Triterpenos (Liebermann-Burchard)	+	++	+
Fenoles (FeCl <sub>3</sub> )	-	+	++
Flavonoides (NaOH)	-	+	+
Flavonoides (Shinoda)	-	-	+
Cumarinas	-	-	-
Taninos	-	+	+
Saponinas	-	-	+
Glicósidos	-	+	+

+: Reacción positiva. ++: Presencia del grupo de metabolito con reacción colorida más intensa. -: Reacción negativa. EH: Extracto hexánico. EM: Extracto metanólico. EA: Extracto acetónico.

### 8.2.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de *A. mollis* 2018

#### Actividad antibacteriana cualitativa

En la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación antibacteriana cualitativa de los extractos de *A. mollis* 2018. Podemos observar que los halos de inhibición de mayor tamaño en *S. aureus* (7 mm) y en *S. epidermidis* (7.66 mm) se obtuvieron con el EA y EH respectivamente. Los demás extractos presentaron halos de 6 mm, con excepción del EM que no resultó activo frente a *S. epidermidis*.

Tabla 11. Actividad antibacteriana cualitativa de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *A. mollis* 2018.

Sustancia a evaluar	Halo de inhibición (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
EH	6.0±0.0	7.66±0.57
EA	7.0±0.0	6.0±0.0
EM	6.0±0.0	NA
C+	17.14±4.56	28.57±2.07

Se muestra el promedio de 3 repeticiones±desviación estándar de los halos de inhibición. EH: extracto hexánico. EA: extracto acetónico. EM: extracto metanólico.

Control positivo: 25 µg/disco de cloranfenicol. NA: sin inhibición..

### Actividad antifúngica cualitativa

Ninguno de los extractos de *A. mollis* presentó actividad antifúngica en las tres especies de levaduras evaluadas (*C. albicans* ATCC 17MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis*) ni en hongo filamentoso *T. mentagrophytes*.

### Actividad antibacteriana cuantitativa

Los resultados de la actividad antibacteriana cuantitativa de los extractos de *A. mollis* 2018 se presentan en la Tabla 12. El EM presentó las CMI y CMB más bajas en ambas especies de *Staphylococcus* (*S. aureus*: CMI= 1.5 mg/mL y CMB>3 mg/mL y *S. epidermidis*: CMI= 0.37 mg/mL y CMB= 1.5 mg/mL). Mientras que con los demás extractos las CMI fueron igual a 3 mg/mL, excepto el EA el cual tiene una CMI= 1.5 mg/mL y una CMB= 3 mg/mL en *S. epidermidis*.

Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos de *A. mollis* 2018

Extracto	Especie bacteriana			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
EH	3.0	>3.0	3.0	>3.0
EA	3.0	>3.0	1.5	3.0
EM	1.5	>3.0	0.4	1.5

EH: extracto hexánico. EA: extracto acetónico. EM: extracto metanólico. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

## ETAPA III

### 8.3. Fraccionamiento biodirigido de los extractos de *A. mollis* 2018

#### 8.3.1. Extracto hexánico (EH)

##### 8.3.1.1. Biorevelado del EH

En la Figura 6 se muestran las cromatoplasmas del EH reveladas con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A) y sulfato cérico (B). Se puede observar que con ambos reveladores las bandas detectadas son similares. Con base en el fraccionamiento en los cromatofolios, estos se cortaron en seis secciones. También se muestra la placa utilizada en la bioautografía que fue bioreveladas con TTC. En el caso de la placa cromatográfica utilizada en *S. aureus* (3C) la banda de la sección 1 que corresponde al punto de aplicación presenta actividad antimicrobiana debido a que no se observa coloración roja.

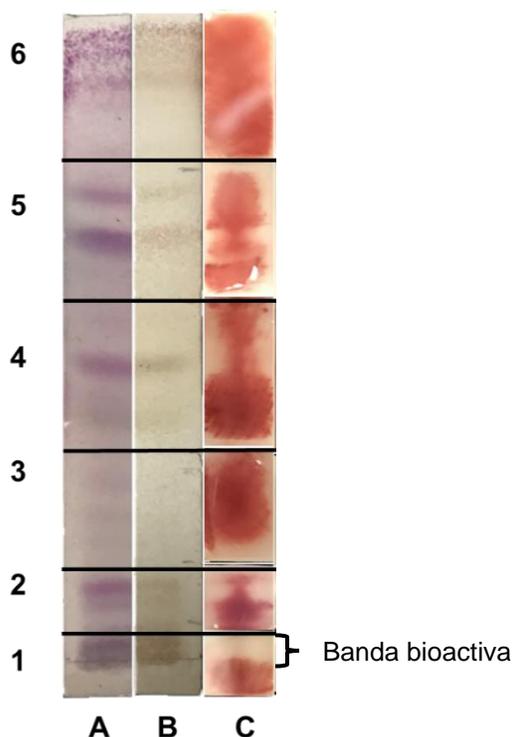


Figura 6. Cromatoplasmas del extracto hexánico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) Vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizada en la bioautografía de *S. aureus*. Fase móvil Hexano/acetato de etilo en proporción 9:1.

### 8.3.1.2. Cromatografía en columna del EH

En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos de fraccionamiento del EH de *A. mollis* 2018 realizado por CC. A partir de 3.66 g de extracto, se obtuvieron un total de 169 alícuotas que fueron agrupadas en 20 fracciones de acuerdo con su perfil en la CCF. En la fracción 3 se recuperó un precipitado (PH3), pero con poco rendimiento. En las fracciones 7 y 8 también se presentaron precipitados (PH7, PH8I y PH8II). En la fracción H9 se detectaron sólidos cristalinos con impurezas (CH9), estos tuvieron un peso de 98.4 mg, es por ello que se decidió purificarlos mediante cromatografía en placa preparativa. Todos los precipitados recuperados en el fraccionamiento presentaron coloraciones moradas al ser revelados con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Tabla 13. Fraccionamiento del extracto hexánico de *A. mollis* 2018.

Polaridad	Alícuotas	Fracción	Peso (g)	Observaciones
100% Hex	1-3	H1	0.0860	
	4-13	H2	0.0406	
	14-31	H3	ND	Precipitados
Hex/AcoEt 98:2	32-52	H4	0.0303	
	53	H5	0.6090	
	54-60	H6	0.1113	
	61-62	H7	ND	Precipitado blanco
Hex/AcoEt 95:5	63-76	H8	ND	Precipitados
	77-83	H9	ND	Cristales blancos en forma de aguja
	84-92	H10	0.1466	
	93-107	H11	0.2139	
Hex/AcoEt 9:1	108-110	H12	0.0206	
	111-117	H13	0.1523	
	118-119	H14	0.1155	
Hex/AcoEt 8:2	120-125	H15	0.1593	
	126-134	H16	0.2305	
Hex/AcoEt 7:3	135-142	H17	0.2514	
	143-158	H18	0.135	
Hex/AcoEt 6:4				
Hex/AcoEt 1:1				
100% AcoEt	159-164	H19	0.0874	
AcoEt/MeOH 1:1	165-169	H20	0.0602	

Peso de los sólidos obtenidos en el fraccionamiento cromatográfico de 3.66 gramos del extracto hexánico de *A. mollis* 2018. Hex: hexano. AcoEt: acetato de etilo. MeOH: metanol. ND: No determinado.

En la Tabla 14 se presentan los puntos de fusión de los precipitados y del sólido cristalino obtenidos en el fraccionamiento del EH de *A. mollis*. Los precipitados (PH7 y PH8I y PH8II) recuperados de las fracciones H7 y H8 mostraron puntos de fusión muy cercanos y oscilan entre los 73 y 81 °C, sin embargo, se decidió dejarlos por separado ya que tenían impurezas. Con respecto al sólido cristalino de la H9 el punto de fusión es de 125-130 °C. La amplitud en la temperatura de fusión indica que no estaban puros. El proceso de purificación se describe en la sección 7.3.2.2.1.

Tabla 14. Punto de fusión de los precipitados obtenidos en el fraccionamiento del extracto hexánico de *A. mollis* 2018.

Alícuotas	Fracción	Nombre del precipitado	Punto de fusión (°C)
61-62	H7	PH7	74-78
63-65	H8	PH8I	73-79
66-76	H8	PH8II	74-81
77-83	H9	SCH9	125-130

### **Sólido cristalino SCH9 de la fracción H9**

De la fracción H9 recuperó un sólido cristalino nombrado como SCH9. Este se filtró y se procesó por medio de una cromatografía en placa preparativa. Se lograron purificar cristales blancos en forma de aguja, los cuales se nombraron como CH9, estos presentaron un color rosa intenso al ser revelados con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lo que indica que se trata de un compuesto terpénico, tuvieron un punto de fusión de 128–130 °C, se disuelven poco en hexano y completamente en solventes medianamente polares como el acetato de etilo. También se analizó su actividad antimicrobiana por el método de bioautografía de contacto (sección 7.3.2.3).

#### **8.3.1.3. Biorevelado de fracciones y precipitados del EH**

En la Tabla 15 se muestra un resumen con la actividad de las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica en columna del EH que fueron evaluadas. Las fracciones que tienen la mayor actividad son las fracciones de las 7 a la 14, con lo que podemos decir que los compuestos bioactivos del extracto hexánico de *A. mollis* 2018 son de baja y media polaridad. Por otro lado, de los seis sólidos evaluados, cuatro presentaron actividad antibacteriana (Figura 7).

Tabla 15. Actividad antibacteriana de las fracciones y precipitados del extracto hexánico de *A. mollis* 2018.

Fracción	Fase móvil	Secciones bioactivas
H1	•	A
H4	95:5 Hex/AcoEt	3
H7	9:1 Hex/AcoEt	1, 2 y 3
H9	8:2 Hex/AcoEt	1 y 3
H11	8:2 Hex/AcoEt	1 y 3
H13	6:4 Hex/AcoEt	2 y 4
H14	6:4 Hex/AcoEt	2
H16	1:1 Hex/AcoEt	2
H18	100% AcoEt	2 y 3
H20	100% AcoEt	2 y 3 ↓
PH3	•	A
PH7	•	↓
PH8I	•	A
PH8II	•	↓
SCH9	•	A
CH9	•	A

↓: disminución del crecimiento bacteriano. A: fracción activa. •: Placas sembradas por punteo y sin eluir. Hex:hexano y AcoEt: acetato de etilo.

En la Figura 7 se muestran las cromatoplasmas de las fracciones H7 y H13 obtenidas en la CC de EH *A. mollis* 2018. Estos cromatofolios fueron revelados con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A) y sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B). Se puede observar que con ambos reveladores las bandas obtenidas son similares. Con base a esto las placas se cortaron en diferentes secciones. También se muestra la placa utilizada en la bioautografía de *S. aureus* biorevelada con TTC (Figura 7C). La fracción H7 presentó bandas activas en las secciones 1, 2, y 3, cabe destacar que ésta última está completamente blanca lo que indica claramente su actividad antibacteriana. En la fracción H13 se encontró una banda bioactiva en la sección 2. De acuerdo con revelado con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> las bandas activas presentaron coloraciones moradas, lo que indica que se trata de compuestos terpénicos.

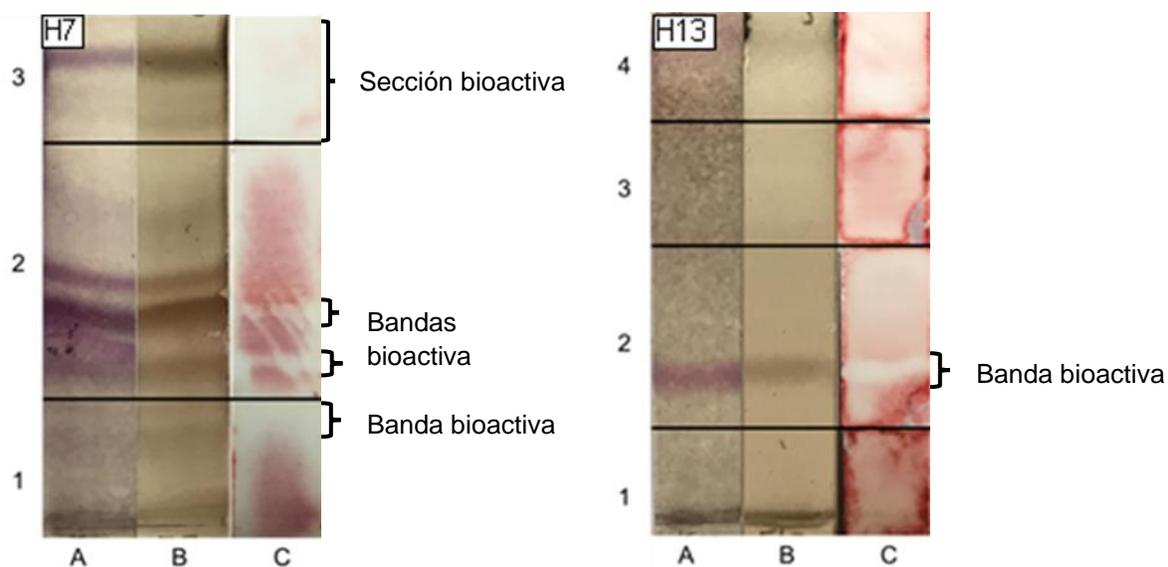


Figura 7. Cromatoplasmas de la fracción H7 y H13 del extracto hexánico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*.

En cuanto a los precipitados, todos presentaron actividad frente a *S. aureus*. En la Figura 8 se muestran los resultados del biorevelado de precipitados PH3, PH8I, SCH9 y CH9, se puede observar que la zona central no hay coloración roja, lo que indica que no hay microorganismos vivos. Por otro lado, los precipitados PH7 y PH8II solo exhibieron disminución del crecimiento (Anexo VI).

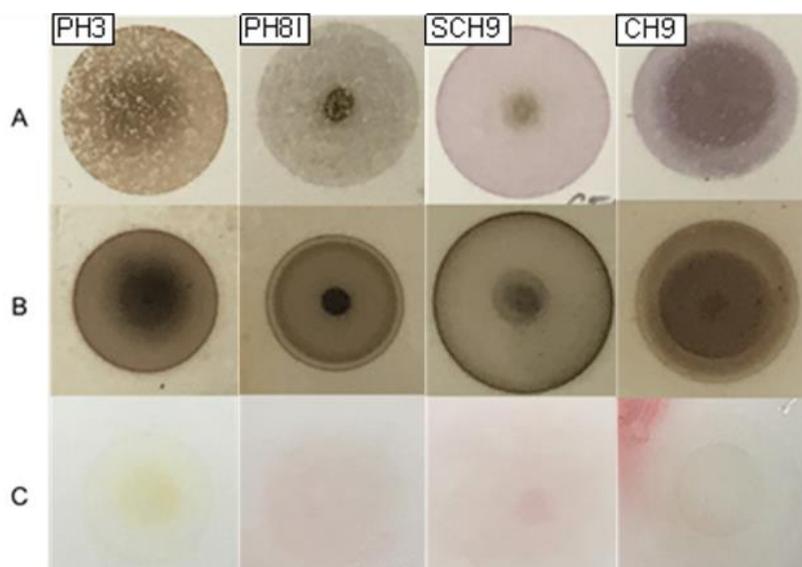


Figura 8. Cromatoplasmas de los precipitados PH3, PH8I, SCH9 y CH9 del extracto hexánico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC en la bioautografía de *S. aureus*.

En el Anexo IX se presentan las imágenes de las demás fracciones y precipitados obtenidos en la CC del EH y que fueron evaluadas en cuanto a su actividad antibacteriana.

### 8.3.2. Extracto acetónico (EA)

#### 8.3.2.1 Biorevelado del EA

En la Figura 9 se muestran las cromatoplasmas del EA, estas se observaron con luz UV y posteriormente se revelaron con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A) y sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B). Con base en las bandas observadas en los cromatofolios, estos se cortaron en seis secciones. En esta Figura (C) también se presenta la placa revelada con TTC en la cual se puede apreciar que los compuestos presentes en las secciones 1, 4 y 6 inhibieron el crecimiento de *S. aureus* debido a que no se observa coloración roja, mientras que los compuestos de las secciones 2, 3 y 5 solo disminuyen el crecimiento de dicha bacteria. Debido a esto, se puede decir que los metabolitos responsables de la actividad del EA de *A. mollis* 2018 son de mediana polaridad.

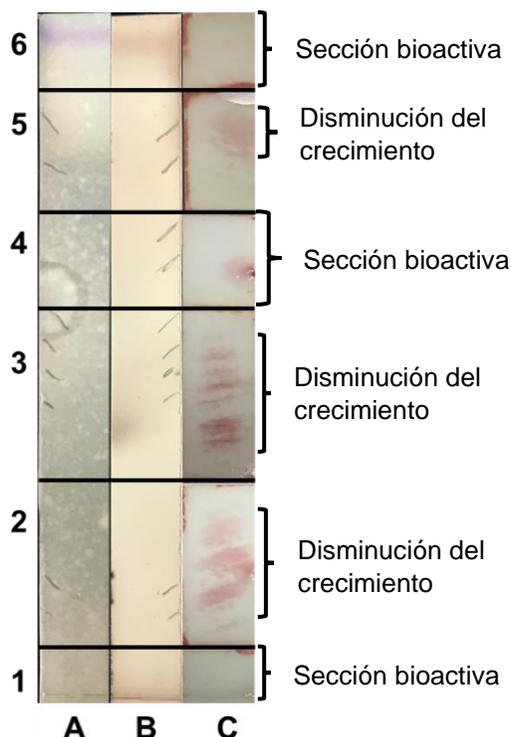


Figura 9. Cromatoplasmas del extracto acetónico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizada en la bioautografía de *S. aureus*. Fase móvil hexano/acetona en proporción 7:3.

### **8.3.2.2. Cromatografía en columna del EA**

Para la CC del EA de *A. mollis* 2018 se utilizaron 5 g de extracto. Se recolectaron un total de 194 alícuotas que se agruparon en 33 fracciones de acuerdo con los patrones obtenidos en las CCF (Tabla 16).

En la fracción A21 de la columna del EA se logró aislar un precipitado de color blanco que presentó coloración morado al ser revelado con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lo que indica que es de naturaleza terpénica tuvo un punto de fusión de 258-261 °C y se disuelve en cloroformo.

Tabla 16. Fraccionamiento del extracto acetónico de *A. mollis* 2018.

Polaridad	Alícuotas	Fracción	Peso (g)	Observaciones
100% Hex	1-15	A1	ND	
Hex/Acetona 98:2	16-19	A2	0.19	
Hex/Acetona 96:4	20-26	A3	0.06	
	27-29	A4	0.17	
Hex/Acetona 9:1	30-44	A5	0.27	
	45	A6	0.026	
	46-53	A7	0.13	
	54	A8	0.06	
	55	A9	0.03	
	56-62	A10	0.06	
Hex/Acetona 8:2	63-80	A11	0.17	
	81-91	A12	0.04	
	92	A13	0.01	
	93	A14	ND	
	94-98	A15	0.01	
	99	A16	ND	
	100	A17	0.01	
Hex/Acetona 7:3	101-117	A18	0.16	
	118-134	A19	0.13	
	135-137	A20	0.11	
Hex/Acetona 6:4	138-146	A21	0.03	Precipitado blanco
Hex/Acetona 1:1, 100% Acetona y Acetona/MeOH 9:1	147-157	A22	0.58	
Acetona/MeOH 9:1 y 8:2	158-162	A23	0.74	
Acetona/MeOH 8:2	63	A24	0.04	
Acetona/MeOH 7:3	164-166	A25	0.11	
	167-169	A26	0.08	
Acetona/MeOH 6:4	170-172	A27	0.16	
Acetona/MeOH 1:1	173	A28	0.1	
	174-183	A29	0.34	
	184-185	A30	0.02	
100% MeOH	186-190	A31	0.04	
	191-193	A32	0.08	

Peso de los sólidos obtenidos en el fraccionamiento cromatográfico de 5 gramos de extracto acetónico de *A. mollis* 2018. ND: No determinado. Hex:hexano. MeOH: metanol.

### 8.3.2.3. Biorevelado de fracciones del EA

En la Tabla 17 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones del EA. Todas tienen compuestos con actividad frente a *S. aureus*, especialmente las fracciones A7, A8, A11, A12, A15, A18 y A22 en las cuales no hay coloración en ninguna de las secciones. Por otro lado, en A27, A29 y A32 se observa disminución del crecimiento bacteriano. Estos resultados indican que los compuestos presentes en el EA que tienen actividad bactericida son medianamente polares y los que exhiben un efecto bacteriostático son de naturaleza polar.

Tabla 17. Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto acetónico de *A. mollis* 2018.

Fracción	Fase móvil	Secciones bioactivas
A2	98:2 Hex/Acetona	1, 2 y 3
A4	8:2 Hex/Acetona	1 y 2
A5	8:2 Hex/Acetona	1-4
A7	7:3 Hex/Acetona	1-4 *
A8	6:4 Hex/Acetona	1-4 *
A9	6:4 Hex/Acetona	1-4 *
A12	1:1 Hex/Acetona	1-4 *
A15	1:1 Hex/Acetona	1-4 *
A18	1:1 Hex/Acetona	3 y 4
A19	1:1 Hex/Acetona	3 y 4
A22	100% Acetona	1-4 *
A23	100% Acetona	2, 3 y 4
A25	9:1 Acetona/MeOH	2, 3, 4 y 5
A27	7:3 Acetona/MeOH	3, 4 y 5 ↓
A29	6:4 Acetona/MeOH	3 ↓
A23	1:1 Acetona/MeOH	1-4 ↓

↓: disminución del crecimiento bacteriano. \*: inhibición de todas las secciones.

Hex: hexano. MeOH: metanol.

Las cromatoplasmas de tres de las fracciones del EA reveladas con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A), sulfato cérico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B) y bioreveladas TTC (C) se presentan en la Figura 10. Todas las secciones de la fracción A8 inhibieron el crecimiento de *S. aureus* debido a que no se presentó coloración roja en ninguna parte de la placa. La fracción A27 contiene compuestos que disminuyen el crecimiento de dicha bacteria ya que tiene secciones en donde se nota una ligera coloración roja.

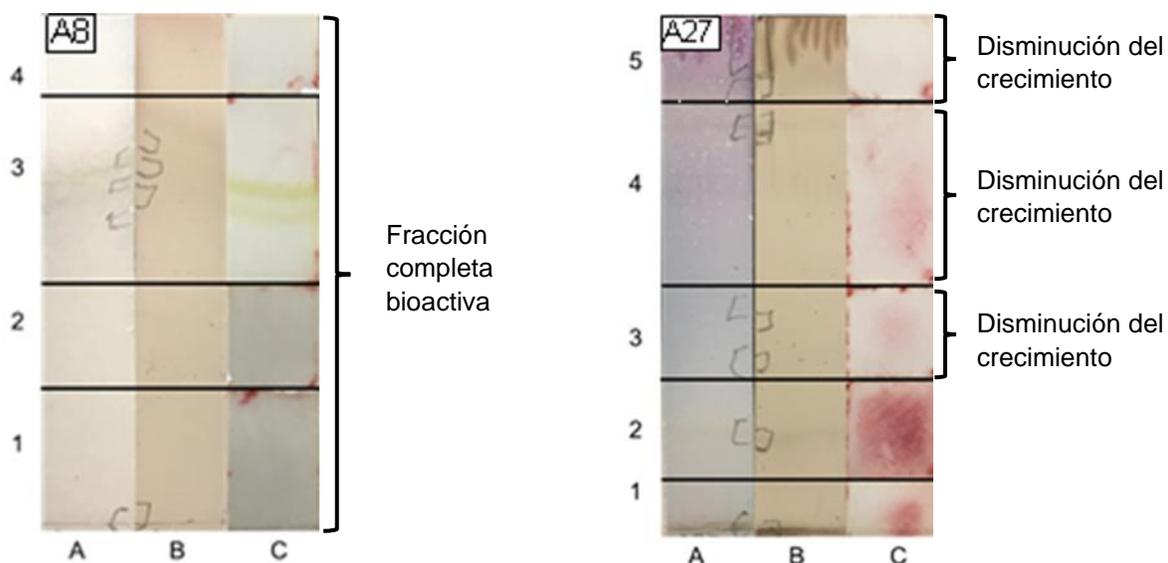


Figura 10. Cromatoplasmas de las fracciones A8 y A27 del extracto acetónico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico y C) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*.

En el Anexo VII se presentan las imágenes de las demás fracciones obtenidas en la CC del EA y que fueron evaluadas en cuanto a su actividad antibacteriana.

### 8.3.3. Extracto metanólico (EM)

#### 8.3.3.1 Biorevelado del EM

En la Figura 11 se muestran las cromatoplasmas del EM eluidas con dos fases móviles diferentes (I y II) para optimizar la separación de los compuestos y poder evaluar la actividad de sus componentes. Estas placas se observaron con luz UV, se revelaron con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A), sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B) y con TTC (C). En la placa eluida con mezcla de cloroformo/metanol 7:3 se observa una notable inhibición del crecimiento de *S. aureus* en las secciones 1, 4 y 5. En el caso de las placas eluidas con la fase móvil acetato de etilo/metanol en proporción 1:1 se puede observar que las secciones 4 y 5 existe una disminución del crecimiento microbiano. Estos resultados nos indican que los compuestos activos presentes en el EM de *A. mollis* 2018 son medianamente polares.

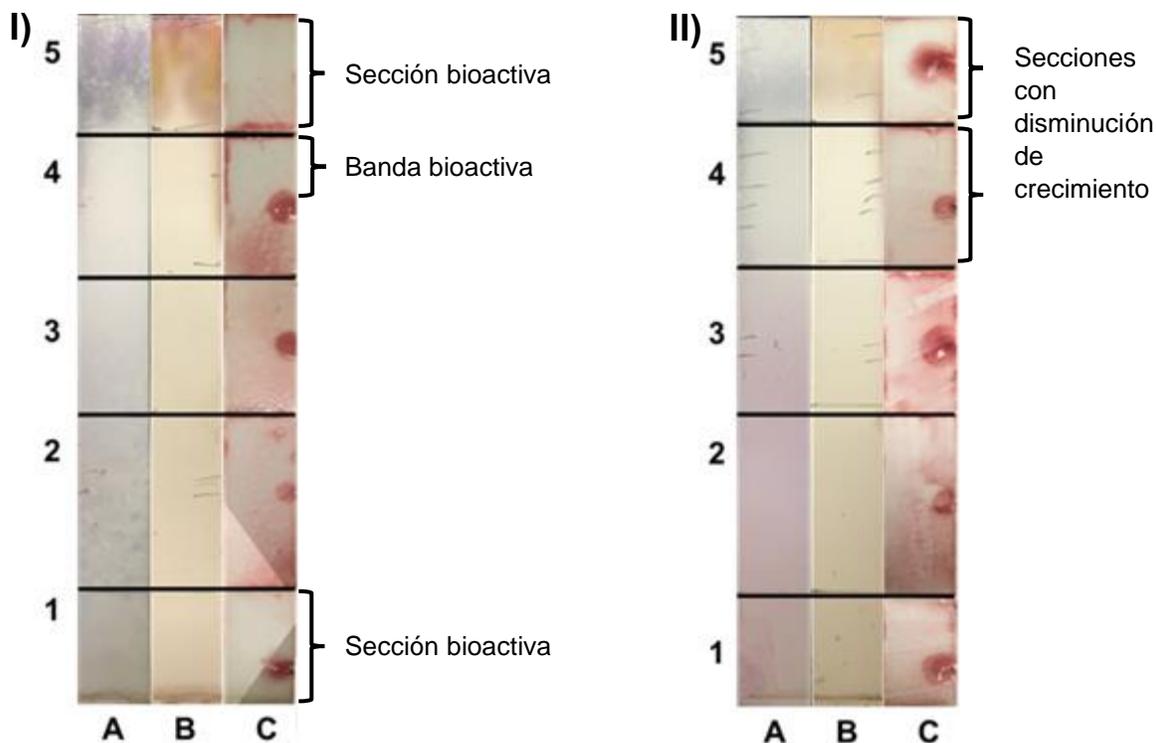


Figura 11. Cromatoplasmas del extracto metanólico de *A. mollis* 2018 eluidas con I) cloroformo/metanol en proporción 7:3 y II) acetato de etilo/metanol en proporción 1:1. Secciones 1-5 de reveladas con: A) vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B) sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y C) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*.

### **8.3.3.2. Cromatografía en columna del EM**

En el fraccionamiento por cromatografía columna del de EM (21.96 g), se obtuvieron 144 alícuotas, las cuales se unieron en 24 fracciones. En la Tabla 17 se presenta el agrupamiento de éstas, así como sus rendimientos.

En las fracciones de la CC del extracto metanólico de *A. mollis* 2018 M5, M6, M10 y M15 a la M24 se obtuvieron 13 precipitados, los cuáles fueron filtrados y posteriormente se determinaron sus puntos de fusión (Tabla 18).

Tabla 18. Fraccionamiento del extracto metanólico de *A. mollis* 2018.

Polaridad	Alícuotas	Fracción	Peso (g)	Observaciones
	1	M1	0.362	
100% AcoEt	1-4	M2	0.0876	
	5-6	M3	0.0223	
AcoEt/MeOH 98:2	7-9	M4	0.3625	
	10-12	M5	0.3243	Precipitado
	13-17	M6	0.447	Precipitado
AcoEt/MeOH 95:5	18	M7	0.0641	
	19-21	M8	0.1804	
	22-26	M9	0.2741	
	27-38	M10	0.8622	Precipitado
AcoEt/MeOH 9: 1	39-49	M11	0.6077	
	50-58	M12	0.3956	Precipitado
	59-63	M13	0.6622	
AcoEt/MeOH 8:2	64-74	M14	1.3144	
	75-80	M15	0.5261	Precipitado
	81-84	M16	0.6007	Precipitado
AcoEt/MeOH 7:3	85-90	M17	0.6427	Precipitado
	91-102	M18	1.0475	Precipitado
AcoEt/MeOH 7:3				
AcoEt/MeOH 6:4	103-140	M19	ND	Precipitado
100% MeOH				
	141	M20	0.659	
H <sub>2</sub> O	142	M21	0.0521	Precipitado
	143	M22	0.0326	
	144	M23	0.0187	
DMSO	Matraces de destilación	M24	ND	Precipitado

Peso de los sólidos obtenidos en el fraccionamiento cromatográfico de 21.96 gramos de extracto metanólico de *A. mollis* 2018. AcoEt: acetato de etilo. MeOH: metanol. H<sub>2</sub>O: agua destilada. DMSO: dimetilsulfóxido

En la Tabla 19 se presentan los puntos de fusión de los precipitados obtenidos en el fraccionamiento del EM de *A. mollis*. Los sólidos obtenidos son bastante complejos debido a que presentan diversas formas, solubilidad y coloraciones además de diferentes puntos de fusión, lo que indica que no son compuestos puros. En las fracciones 18, 19, 21 y 22 se detectó la presencia de sólidos cristalinos que no funden hasta los 300 °C de acuerdo con el ensayo a la flama y son solubles en agua lo que nos indica que probablemente se trata de una sal.

Tabla 19. Punto de fusión de los precipitados obtenidos en el fraccionamiento del extracto metanólico de *A. mollis* 2018.

Alícuotas	Fracción	Nombre del precipitado	Punto de fusión (°C)
10-12	M5	PM5	89-90, 264-267
13-17	M6	PM6	179-209
27-38	M10	PM10	243-285, 197-200 y 193-198
50-58	M12	PM12	189-193
75-80	M15	PM15	75-80
81-84	M16	PM16	115-119 y 172-180
85-90	M17	PM17	214-229
91-102	M18	PM18	192-203 y probablemente sales
103-140	M19	PM19	Probablemente sales
141	M20	PM20	155-164, 260-266 y 294-300
142	M21	PM21	260-268 y probablemente sales
143	M22	PM22	Probablemente sales
Matraces de destilación	M24	PM24	ND

ND: No determinado

### 8.3.3.3. Biorevelado de fracciones del EM

En la Tabla 20 se presenta un resumen de la actividad de las fracciones del EM seleccionadas para la evaluación por bioautografía. Algunas secciones de las fracciones M2, M6, M12, M16, M18, M19 y M21 presentan una leve disminución del crecimiento microbiano de *S. aureus*, esto debido a que presentan una tenue coloración roja, lo que indica el efecto bacteriostático de los compuestos. Por otro lado, las M4, M10, M14 y M23 no tuvieron actividad frente a dicha bacteria. Estos resultados nos dicen que los compuestos presentes en el EM de *A. mollis* 2018 podrían tener efecto sinérgico entre ellos, esto debido a que la actividad antibacteriana obtenida con el extracto completo (Figura 11) es mayor a la observada en las fracciones (Figura 12).

Tabla 20. Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de *A. mollis* 2018.

Fracción	Fase móvil	Secciones bioactivas
M2	98:2 AcoEt/MeOH	2 ↓
M4	98:2 AcoEt/MeOH	NA
M6	95:5 AcoEt/MeOH	1-4 ↓
M9	9:1 AcoEt/MeOH	4
M10	8:2 AcoEt/MeOH	NA
M12	6:4 AcoEt/MeOH	4 ↓
M14	1:1 AcoEt/MeOH	NA
M16	1:1 AcoEt/MeOH	1, 2 y 5 ↓
M18	3:7 AcoEt/MeOH	3 y 4 ↓
M19	2:8 AcoEt/MeOH	1 y 4 ↓
M21	1:9 AcoEt/MeOH	4
M24	•	NA

↓: disminución del crecimiento. NA: fracción no activa. •: Placa sembrada por punteo y sin eluir. AcoEt: acetato de etilo. MeOH: metanol.

En la Figura 12 se muestran las cromatoplasmas de tres de las fracciones obtenidas por medio de la cromatografía en columna de extracto metanólico reveladas con sulfato cérico (A) y TTC (B). La fracción M2 aún presenta una leve coloración roja, lo que indica que los compuestos presentes en dicha fracción tienen actividad bacteriostática. La fracción M14 no exhibió actividad en *S. aureus* ya que todas las secciones se colorearon de rojo. En la fracción M21 la sección 4 contiene compuestos que muestran bioactividad frente a la bacteria antes mencionada.

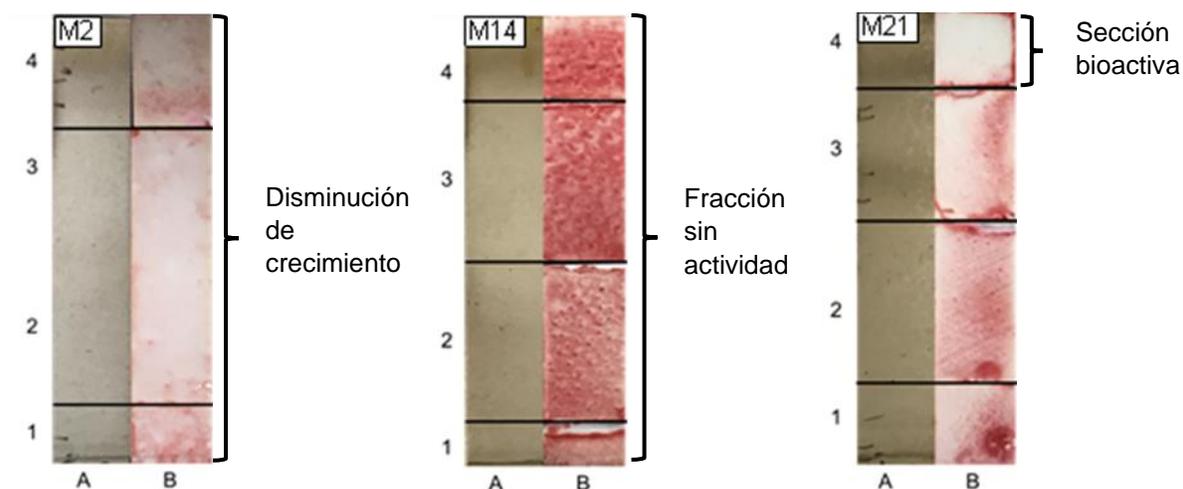


Figura 12. Cromatoplasmas de las fracciones M2, M14 y M21 del extracto metanólico de *A. mollis* 2018 reveladas con: A) sulfato cérico/ $H_2SO_4$  y B) TTC utilizadas en la bioautografía de *S. aureus*.

En el Anexo VIII se presentan las imágenes de las demás fracciones obtenidas en la CC del EM que fueron evaluadas en cuanto a su actividad antibacteriana.

## 9. DISCUSIÓN

### ETAPA I

#### 9.1. Evaluaciones preliminares de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*

En todo el mundo se ha reportado que los géneros *Ficus* y *Acalypha* se utilizan en medicina popular para el tratamiento de diversas enfermedades causadas por microorganismos gracias a sus constituyentes químicos (Alqasoumi *et al.*, 2014 y Seebaluck *et al.*, 2015).

##### 9.1.1. Rendimientos de los extractos de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*

Los EM de *F. petiolaris* y *F. cotinifolia* fueron los de mayor rendimiento (7.2 y 7.8 % respectivamente) (Tabla 6). Mandal y colaboradores en el 2000, realizaron extractos de las hojas de *F. racemosa* con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, benceno, cloroformo, acetona, metanol y agua), a partir de 500 g de hojas secas reportan los extractos de alta polaridad presentaron mayor rendimiento (metanol 12.92% y agua 10.13%).

En el caso de *A. mollis* el extracto que presentó mayor rendimiento fue el EM (12.8%) y el menor fue el EH (1%) (Tabla 6). Estos resultados son similares a los obtenidos por Zavala y colaboradores en el 2008, dichos autores mencionan que el extracto de *A. aff. mollis* con menor rendimiento fue el obtenido con hexano (1.2%) y que los de mayor rendimiento fueron los extractos de alta polaridad (metanol 5.8% y agua 8.9%).

Es difícil contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo con otros reportes, puesto que la cantidad de material vegetal que utilizan en otras investigaciones es mayor, pero se observa la tendencia de que los extractos polares son los más abundantes. Además, Dhanani y colaboradores en el 2017 mencionan que el rendimiento de los extractos varía por muchos factores como la composición química de los mismos, el proceso de extracción y la polaridad del disolvente. Sin embargo, si se mantiene el hecho de que en estos géneros es mayor la producción de compuestos polares respecto a los no polares.

### 9.1.2. Caracterización química cualitativa de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*

En la Tabla 7 podemos observar que los EM de estas tres especies vegetales presentaron la mayor diversidad de grupos de metabolitos secundarios.

Los EM de *F. petiolaris* y *F. cotinifolia* presentan flavonoides, fenoles, taninos, glicósidos, cumarinas y terpenos (Tabla 7), lo cual corresponde con lo reportado en una revisión de la especie *F. sycomorus* L. hecha por Hossain en el 2019. Estos autores mencionan que los compuestos aislados de la parte aérea y en las raíces son diferentes tipos de terpenoides, fenilpropanoides, ácidos fenólicos y flavonoides. Otros autores reportan la presencia de taninos, polifenoles, esteroides, saponinas, flavonoides en los extractos de diferentes polaridades de *F. auriculata* y *F. retusa* L. (Gaire *et al.*, 2011; Semwal *et al.*, 2013). Por otro lado, Gaire y colaboradores (2011) también reportan la presencia de alcaloides, lo que difiere con lo obtenido en el presente trabajo. Lo anterior puede deberse a la parte y cantidad utilizada, pues los extractos obtenidos por estos autores fueron hechos a partir de 4 kg de corteza seca de *F. auriculata*.

La especie *A. mollis* presentó casi todos los grupos de metabolitos secundarios estudiados. Estos resultados concuerdan con lo reportado por diversos autores, los cuales mencionan que el género *Acalypha* tiene diferentes clases de metabolitos. Por ejemplo, Gutierrez-Lugo y colaboradores (2002) encontraron triterpenos tipo cicloartano en *A. communis*. En extractos de *A. integrifolia* Willd. se ha detectado la presencia de terpenos, taninos, polifenoles, saponinas, cumarinas, flavonoides y azúcares (Seebaluck-Sandoram *et al.*, 2018).

En el extracto acetónico de *A. mollis* se detectaron sólo flavonoides, glicósidos y triterpenos. A diferencia de lo reportado también por Takle y colaboradores en el 2011 quienes indican que la fracción clorofórmica de *A. indica* contiene alcaloides y la de acetato de etilo flavonoides y taninos. Las diferencias pueden deberse a que estos autores obtuvieron fracciones de diferentes polaridades a partir de un extracto etanólico, el cual podía contener otros grupos de metabolitos como son esteroides y carbohidratos.

### 9.1.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de *F. petiolaris*, *F. cotinifolia* y *A. mollis*

La investigación de las plantas medicinales se ha vuelto muy importante ya que tienen un gran potencial terapéutico para curar muchas enfermedades infecciosas (Gaire *et al.*, 2011). Los nueve extractos obtenidos de las partes aéreas de las tres especies fueron evaluados contra dos especies bacterianas que causan infecciones cutáneas en humanos las cuales fueron *S. aureus* y *S. epidermidis*.

#### Actividad antibacteriana cualitativa

Los EA de las especies de *Ficus* tuvieron actividad en ambas cepas de *Staphylococcus*. En el caso de los EH, éstos sólo mostraron actividad en *S. aureus*. Ninguno de los extractos metanólicos de las especies de *Ficus* exhibieron actividad (Tabla 8). Esto difiere a lo reportado por diversos autores como Kuete y colaboradores en el 2008, ellos registraron halos de inhibición en *S. aureus* de 14 y 16 mm con los extractos metanólicos de *F. chlamydocarpa* y *F. cordata*, respectivamente. El extracto metanólico de *F. auriculata* también es activo frente a *S. aureus* (Gaire *et al.*, 2011), al igual que el extracto etanólico de la corteza de *F. religiosa* Forssk. y *F. recemosa* (Nair y Chanda, 2007). Estas diferencias en la actividad reportada en la bibliografía pueden deberse a que en el presente trabajo se utilizaron 5 g de material vegetal, mientras que estos autores utilizaron cantidades mayores a 1 kg, además de analizar otros órganos de la planta, como lo es la corteza.

Como se mencionó anteriormente, los EM de *F. cotinifolia* y *F. petiolaris* presentaron taninos en la detección de metabolitos (Tabla 7), sin embargo, no fueron activos frente a las especies de *Staphylococcus* utilizadas. Esto difiere a lo reportado por Gaire y colaboradores en el 2011, quienes mencionan que los taninos pueden ser los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana que muestran las especies de *Ficus*, sin embargo, esto puede deberse a las partes utilizadas de las plantas. Como reportan Khatoon colaboradores en el 2010, los taninos responsables de actividad antimicrobiana se encuentran en la corteza y en el presente estudio se utilizaron solo ramas y hojas.

Los tres extractos de *A. mollis* presentaron actividad frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* (halos entre 6 y 7 mm). Algunos autores mencionan que muchas especies del género *Acalypha* muestran actividad antimicrobiana. Por ejemplo, *A. monostachya* exhibió efectos inhibitorios contra *S. aureus* y *S. epidermidis*, con el EM se reportan halos de 9.0 y 8.6 mm,

respectivamente y con el EH halos de 7 mm en ambas especies (Canales *et al.*, 2011). Los extractos de alta polaridad de *A. mollis* podrían tener compuestos como el ácido gálico, que es activo contra *S. aureus* y *E. coli* (Lamikanra, *et al.*, 1990) o la corilagina, la cual es eficaz frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, MERSA, *K. pneumoniae* y *C. albicans* (Burapadaja y Buncho, 1995).

La actividad antimicrobiana observada de los extractos de *A. mollis*, *F. petiolaris* y *F. cotinifolia* puede atribuirse a la presencia de compuestos como flavonoides, saponinas, taninos glicósidos y fenoles presentes en las hojas. Se ha reportado que este tipo de compuestos desempeñan un papel importante en la inhibición y el retraso del crecimiento bacteriano (Oluduro *et al.*, 2011; Zahidin *et al.*, 2017).

### **Actividad antifúngica cualitativa**

Ninguno de los extractos preliminares de las tres especies vegetales presentó actividad en levaduras ni en el hongo *T. mentagrophytes*. Los hongos son de los microorganismos más resistentes a los compuestos antimicrobianos, esto es debido a que pueden presentar resistencia innata o primaria (la cual se da antes de la exposición a una molécula antifúngica) y a su gran capacidad de adaptación a los cambios ambientales (Pontón y Quindós, 2006).

Los hongos han desarrollado diversos mecanismos por los cuales generan resistencia a los antifúngicos, como la sobreproducción de blancos enzimáticos, implementación de vías metabólicas alternas y la producción de bombas de flujo (Mesa y Bueno, 2004).

## **ETAPA II**

### **9.2. Estudio de *A. mollis* 2018**

Recapitulando todo lo anterior, los extractos de la especie *A. mollis* fueron los que presentaron mejor actividad antibacteriana, es por ello por lo que se seleccionó esta especie vegetal para continuar con las etapas posteriores.

#### **9.2.1. Rendimiento y caracterización química cualitativa de los extractos de *A. mollis* 2018**

En la Tabla 9 se muestran los rendimientos obtenidos de la especie *A. mollis* colectada en el 2018. El extracto EM (10.6%) tiene mayor rendimiento en comparación con el EH

(1.82%). Estos resultados son similares a los que se reportan con anterioridad en la sección 8.1.2 (Tabla 6). Por lo que los resultados obtenidos en esta etapa también pueden ser respaldados con lo reportado por Zavala y colaboradores en el 2008, quienes mencionan que el extracto de *A. aff. mollis* con mayor rendimiento fueron los extractos de alta polaridad.

### **9.2.2. Caracterización química cualitativa de los extractos de *A. mollis* 2018**

Los extractos de *A. mollis* 2018 presentaron casi todos los tipos de metabolitos secundarios evaluados, con excepción de alcaloides y cumarinas (Tabla 10). Esto se respalda por lo mencionado por Subbarayan y colaboradores (2010), quienes indican que los extractos de diferentes polaridades de *A. fruticosa* tienen compuestos triterpenoides, esteroides, taninos, fenoles y flavonoides. Fawzy y colaboradores en el 2017 estudiaron la especie *A. fruticosa*, donde primero realizaron una columna cromatográfica del extracto metanólico y posteriormente los compuestos que lograron purificar fueron analizados por medio de espectroscopía de masas y resonancia magnética, llegando a la conclusión de que *A. fruticosa* contiene como metabolitos principales el glucósido de la 2-metil-5,7-dihidroxicromona, la acalifina, la apigenina y el kaempferol.

### **9.2.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de *A. mollis* 2018**

#### **Actividad antibacteriana cualitativa**

Podemos observar en la Tabla 11 que todos los extractos de *A. mollis* tienen actividad contra *S. aureus* (halos de entre 6 y 7 mm). Los EH y el EA exhibieron actividad frente a *S. epidermidis*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Teklani y Perera en el 2016, ellos mencionan que los extractos de diferentes polaridades de *A. indica* presentaron halos de inhibición de 7 mm frente a una cepa de *S. aureus*.

El EM fue activo contra *S. aureus* (hola de inhibición de  $6.0 \pm 0.0$  mm) pero no frente *S. epidermidis*. Adesina y colaboradores (2000) mencionan que los extractos metanólicos de *A. ciliata*, *A. indica*, *A. hispida* y tres variedades de *A. wilkesiana* presentan halos de inhibición de entre 3 y 10.5 mm frente a *S. aureus*.

Los halos de inhibición de mayor tamaño los presentó el EH. Pragada *et al.*, 2011 reportan que el extracto hexánico de *A. indica* inhibe el crecimiento de varias especies de bacterias incluyendo a *S. epidermidis* y que contiene terpenoides y esteroides. Marrez y colaboradores (2017) mencionan que *A. wilkesina* posee propiedades antibacterianas las

cuáles se deben a la presencia de compuestos del tipo sesquiterpenos, monoterpenos y triterpenoides entre otros.

### **Actividad antifúngica cualitativa**

Ninguno de los extractos de *A. mollis* 2018 presentó actividad en levaduras ni en *T. mentagrophytes*. Esto difiere a lo publicado por autores como Canales y colaboradores (2011) quienes reportan que el EM de *A. monostachya* tiene una  $CL_{50}$ = 430  $\mu$ /mL frente a *T. mentagrophytes* y por lo mencionado por Adesina y colaboradores (2000), ellos señalan que dos variedades de *A. wilkesiana* presentan actividad contra *C. pseudotropicalis* (halos de inhibición de 12 y 9 mm). Es probable que los extractos *A. mollis* utilizados en el presente estudio no contengan los compuestos responsables de la actividad antifúngica que presentan otras especies del género *Acalypha*. Adesina y colaboradores (2000), también mencionan que las propiedades antimicrobianas de la *A. wilkesiana* y de *A. hispida* se deben, principalmente, a la geraniina; si bien en el EM de *A. mollis* se detectó la presencia de taninos, puede ser que no esté presente este compuesto o no se alcance la concentración necesaria para exhibir un efecto antifúngico. Top y colaboradores (2017) mencionan que las condiciones ambientales influyen en la composición de los taninos de las plantas. Entre ellas se encuentran el fotoperiodo, el pH del suelo, la disponibilidad de nutrientes.

### **Actividad antibacteriana cuantitativa**

Los resultados de la actividad antibacteriana cuantitativa de los extractos de *A. mollis* colectada en el 2018 se presentan en la Tabla 12. El extracto que exhibió las CMI más bajas para *S. aureus* y *S. epidermidis* fue el EM (CMI= 1.5 y 0.3 mg/mL respectivamente). Esto es similar a lo reportado por Noumedem, y colaboradores (2013) quienes reportan que extracto metanólico de *A. manniana* impide el crecimiento de *S. aureus* a una CMI=0.25 mg/mL. También Canales y colaboradores (2011) reportan que el EM de *A. monostachya* fue activo en *S. aureus* y *S. epidermidis*, presentando CMI de 1.5 mg/mL en ambas especies. Otros autores evaluaron la actividad antimicrobiana de *A. indica* y reportan que el extracto que presenta CMI más pequeñas es el metanólico (Soruba *et al.*, 2015).

Solomon y colaboradores (2005) mencionan que los extractos metanólicos de *Acalypha indica* suelen ser más activos debido a que contienen más compuestos bioactivos. Seebaluck-Sandoram y colaboradores (2018) mencionan que los grupos de metabolitos

secundarios como taninos, polifenoles, cumarinas, flavonoides y glicósidos pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana de *A. integrifolia*. Esto coincide con la actividad de *A. mollis* observada en el presente estudio ya que de acuerdo con las pruebas coloridas para detectar los principales tipos de metabolitos secundarios (Tabla 9) se determinó que el extracto metanólico dio positivo a triterpenos, fenoles, flavonoides, cumarinas, taninos, saponinas y glicósidos.

## **ETAPA III**

### **9.3. Fraccionamiento biodirigido de los extractos de *A. mollis* 2018**

#### **9.3.1. Extracto hexánico (EH)**

##### **9.3.1.1. Cromatografía en columna del EH**

La mayoría de las fracciones obtenidas del EH de *A. mollis* al ser reveladas con vainillina dan coloraciones moradas y rosas, lo que nos indica que se trata de compuestos de tipo terpénico (Wagner, 2001), lo cual coincide con los resultados de las pruebas coloridas de este extracto (Tabla 7 y 10). La polaridad de las fracciones y compuestos obtenidos es baja ya que la mayoría se disuelven en hexano, solo pocas se disuelven por completo en acetato de etilo.

El punto de fusión determinado para el sólido cristalino SCH9 obtenido en el fraccionamiento del EH fue de 128–130 °C (Tabla 14). El rango en el punto de fusión, además del perfil cromatográfico en CCF, significa que el compuesto no está completamente puro. Ya que como lo dice Domínguez, 1980, el punto de fusión para un compuesto puro no debe variar en más de 1° C.

##### **9.3.1.2. Biorevelados del EH y de sus fracciones**

El biorevelado del EH de *A. mollis* (Figura 6C) muestra que este extracto tiene actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ya que en las zonas de mayor polaridad (punto de aplicación) las placas no se tiñeron de rojo al ser revelada con TTC.

Por otro lado, en el biorevelado de las 10 fracciones del EH de *A. mollis* 2018, se observa que son activas debido a que en todos los cromatofolios existen algunas bandas sin coloración (Tabla 15 y Anexo VI).

Al comparar las bandas bioactivas presentes en el extracto y en las fracciones con las placas las reveladas con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se observa que las bandas bioactivas con TTC presentan coloraciones moradas cuando son reveladas con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lo que significa que son compuestos de tipo terpénico. Aunque el mecanismo de acción de los terpenoides no se comprende completamente, se especula que por ser compuestos lipofílicos (Savoia, 2012) pueden interactuar con los lípidos presentes en la membrana celular de las bacterias, lo que las hace más permeables y conduce a la ruptura del organelo provocando la fuga extensa de los componentes celulares y pérdida de iones (Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2012 y Tariq *et al.*, 2019). Los terpenos también pueden interactuar con las proteínas incorporadas a la membrana, cambiando su conformación y por lo tanto su funcionalidad comprometiendo así la supervivencia de las bacterias (Radulovic *et al.*, 2013).

### **9.3.2. Extracto acetónico (EA)**

#### **9.3.2.1. Cromatografía en columna del EA**

En cuanto al EA, la mayoría de las fracciones obtenidas necesitan de un solvente de baja polaridad para disolverse, como son las mezclas de hexano-acetona (Tabla 16). Complementando con los datos presentados en la Tabla 9, se puede afirmar que los compuestos presentes en estas fracciones podrían tener naturaleza de tipo terpénica de baja y mediana polaridad.

El precipitado obtenido en la fracción A21 presentó un punto de fusión de 258-261 °C, lo que nos indica que aún presenta impurezas debido a que los compuestos puros tienen una diferencia de máximo 1°C (Domínguez,1980). El precipitado A21 al ser revelado con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, presenta una coloración morada, por lo que su naturaleza es terpénica (Wagner, 2001). Se han reportado varios terpenos en algunas especies del género *Acalypha* como los ácidos 16 $\alpha$ -hidroxicólico, 15  $\alpha$ -hidroxicólico, 7 $\beta$ ,16  $\beta$ -dihidroxi-1,23-dideoxijésico (Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002) o cuadrangularíco (Anokwuru *et al.*, 2015).

#### **9.3.2.2. Biorevelados del EA y de sus fracciones**

En el biorevelado del EA (Figura 9) la sección 1, de los compuestos más polares, y las secciones 4 y 6 de los compuestos menos polares, presentaron una inhibición del crecimiento de *S. aureus*. Por otro lado, la actividad antimicrobiana de las fracciones del EA se presenta en la Tabla 17, prácticamente todas las fracciones evaluadas presentaron

secciones bioactivas, lo que corresponde con lo observado en el biorevelado general del EA completo.

Tanto el EA como las fracciones obtenidas por CC presentan bandas bioactivas al ser reveladas con TTC, además de coloraciones moradas o rosas al reaccionar con la vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, indicando que son compuestos terpénicos. Selvamani y Balamurugan (2015) reportan que *A. indica* también presenta compuestos de tipo terpenoide. Este amplio grupo de metabolitos además de permeabilizar las membranas bacterianas (Betancourt *et al.*, 2012) ambas al final actúan de otras maneras, por ejemplo, pueden interrumpir otras actividades celulares de las bacterias incluyendo la producción de energía y el transporte de membrana (Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 2012).

El EA además de terpenos, en las pruebas coloridas presentó compuestos de tipo fenoles, flavonoides y taninos (Tabla 10). En la especie *A. wilkesiana* se han reportado metabolitos como el galato de metilo y los ácidos gálico, elágico, brevifolincarboxílico (Marrez *et al.*, 2017). Selvamani y Balamurugan (2015) mencionan que la especie *A. indica* también contiene metabolitos de tipo terpenoide, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos. Estos desempeñan un papel importante en la inhibición y el retraso del crecimiento bacteriano debido a que pueden dañar la membrana celular, provocar la inactivación y la pérdida de función de las proteínas y enzimas bacterianas unidas a esta, lo que conduce a su muerte (Savoia, 2012).

### **9.3.3. Extracto metanólico (EM)**

#### **9.3.3.1. Cromatografía en columna del EM**

Con el fraccionamiento del EM de *A. mollis* 2018 se obtuvieron 24 fracciones de mediana a alta polaridad (Tabla 18). En muchas de las fracciones se logró obtener precipitados los cuales tienen puntos de fusión con un rango muy amplio (Tabla 19) lo que indica que aún presentan impurezas (Domínguez, 1980), y/o que son varios los compuestos que están precipitando del extracto.

El EM presentó la mayor diversidad de grupo de metabolitos secundarios en las pruebas coloridas (Tabla 10) como compuestos fenólicos, flavonoides y taninos. En especies del género *Acalypha* como *A. hispida* se han identificado algunos flavonoles como kaempferol y la quercetina (Noumedem *et al.*, 2013), en *A. wilkesiana* se identificaron compuestos como

ácido gálico, corilagina y geranina (Seebaluck *et al.*, 2015). Ying-Tsun y colaboradores (1997) informaron la presencia de compuestos fenólicos como la geranina, la corilagina, el ácido chebulágico y la glucogalina en *A. indica*. Muchos de estos flavonoides detectados en especies de *Acalypha* son reportados con actividades terapéuticas como antibacterianos (Zahidin, *et al.*, 2017).

### 9.3.3.2. Biorevelados del EA y de sus fracciones

El biorevelado de las dos placas del EM (Figura 11) indica que los compuestos presentes en las secciones 4 y 5 exhibieron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*. Estos metabolitos podrían ser de tipo fenólicos, flavonoides y taninos, de acuerdo con revelado químico con sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Flavonoles como la quercetina y el kaempferol pueden destruir la membrana citoplasmática e inhibir el metabolismo energético (Ahmad *et al.*, 2015). Esto es gracias a sus grupos funcionales, por ejemplo, los grupos OH interactúan con la membrana celular de las bacterias mediante puentes de hidrógeno modificando su estructura, lo que induce la pérdida de contenido celular. Los dobles enlaces del núcleo aromático pueden provocar alteraciones en la membrana, afectando la fuerza protón-motriz, reduciendo el gradiente de pH y en consecuencia la producción de ATP (Bouarab-Chibane *et al.*, 2018). Por otro lado, los taninos pueden inhibir o formar complejos con las enzimas, proteínas y polisacáridos, tienen acción directa sobre las membranas de los microorganismos, el metabolismo bacteriano a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa y la quelación de iones metálicos (Scalbert, 1991 y Akiyama *et al.*, 2001). Din y colaboradores (2013) mencionan que los elagitaninos presentes en *A. wilkesiana* se caracterizan por su grupo hexahidroxi-difenilo que libera ácido elágico, también son capaces de precipitar las proteínas y eliminar los cofactores metálicos provocando así la muerte de las bacterias.

Las fracciones del EM de *A. molis* 2018 en su mayoría sólo disminuyeron el crecimiento de *S. aureus* (Tabla 12 y Anexo VIII). Si comparamos los resultados de las fracciones con lo observado en el biorevelado del extracto metanólico, podemos decir que la actividad del extracto es mayor a la actividad de las fracciones, esto puede deberse a efectos sinérgicos entre los diversos compuestos presentes en la planta. Los extractos de plantas están formados por mezclas complejas de compuestos (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009), las cuales pueden ser capaces de llegar a múltiples sitios objetivo, esto les otorgó a las plantas la capacidad de presentar efectos polifarmacológicos a lo largo de la evolución (Gertsch,

2011). Esta característica puede proporcionar a las mezclas vegetales de compuestos bioactivos la capacidad de ejercer efectos terapéuticos sinérgicos (Wagner, 2011).

Hay cuatro mecanismos teóricos de interacciones antimicrobianas que producen sinergia: (I) la inhibición secuencial de varios pasos en una determinada vía bioquímica, (II) la inhibición de las enzimas que degradan o expulsan los antimicrobianos, (III) la interacción de varios antimicrobianos con la pared celular, o (IV) la interacción con la pared o la membrana celular que conduce a una mayor captación de otros antimicrobianos. Otra posibilidad de que se produzcan efectos sinérgicos podría ser que los compuestos antimicrobianos tengan un modo de acción diferente (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Un ejemplo de sinergia es el presentado por Tomás-Menor y colaboradores (2015), ellos determinaron que las combinaciones entre los flavonoles (glucósido de quercetina y mircetina), un elagitanino (punicalagina) y su unidad monomérica (ácido elágico) presentes en el extracto acuoso de *Cistus salviifolius* L., mostraron un claro comportamiento sinérgico contra *S. aureus*. Estos autores mencionan este fenómeno puede deberse a que estos metabolitos tienen la capacidad de mostrar preferencias por dianas moleculares completamente diferentes, por ejemplo, la punicalagina alcanza su objetivo molecular en la membrana bacteriana debido a su mayor tamaño, mientras que el ácido elágico puede ejercer actividad en sitios más profundos, esto podría explicar la fuerte actividad antimicrobiana del extracto completo de *A. mollis*. También mencionan que el extracto de *C. salviifolius* es una combinación compleja de polifenoles, por lo que pueden producirse otras interacciones múltiples desconocidas.

#### **9.4 Discusión final**

Los extractos y las fracciones de *Acalypha mollis* demostraron tener actividad frente a *Staphylococcus aureus*, esto es relevante debido a que esta bacteria es un patógeno facultativo que se encuentra en la piel y las superficies nasales (Bitschar *et al.*, 2020), es importante en el ámbito hospitalario debido a que corresponde al aislamiento microbiológico más frecuente encontrado en las infecciones de la piel. También *S. aureus* es capaz de provocar una variedad de enfermedades debido a que tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones extremas y propagarse a través de los tejidos del huésped (Braz *et al.*, 2020).

*S. aureus* pertenece a un grupo de patógenos llamados “ESKAPE” (Boucher *et al.*, 2009); estas siglas derivan de la primera letra del nombre científico de cada una de estas bacterias

(*Enterococcus* spp, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp). Este grupo de seis microorganismos han probado su capacidad para relativamente “escapar” de los efectos de casi cualquier antimicrobiano, además la causa principal de las infecciones hospitalarias (Chávez-Jacobo, 2020).

Los productos naturales extraídos de plantas se identifican como una fuente de compuestos bioactivos con un amplio espectro de acciones diferentes de los antibióticos tradicionales (Porfírio *et al.*, 2017).

Se han estudiado diversas especies de plantas medicinales que producen fitoquímicos activos contra una amplia gama de microorganismos (Gibbons, 2004), incluyendo a especies del género *Acalypha*. Dichas plantas son importantes en la medicina tradicional de muchos países, además en todo el mundo se han publicado investigaciones donde se describe que este género contiene compuestos bioactivos que podrían contribuir directa o indirectamente a sus propiedades biológicas (Seebaluck *et al.*, 2015). En este estudio determinamos que *A. mollis* presenta terpenos, fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos, saponinas y glicósidos, además de que tiene actividad antibacteriana frente a *S. aureus*. Esto comprueba el uso tradicional que se les ha dado en México y en otros países a muchas especies de *Acalypha*.

## 10. CONCLUSIONES

- En los extractos hexánicos de las especies de *Ficus* se detectó la presencia de terpenos; en los acetónicos flavonoides, cumarinas y glicósidos; y en los metanólicos fenoles y glicósidos. Por otro lado, el extracto metanólico preliminar de *A. mollis* presentó la mayor diversidad de grupos de metabolitos secundarios.
- Los extractos polares de las especies de *Ficus* no exhiben actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, mientras que los extractos preliminares de *A. mollis* presentaron actividad antimicrobiana en ambas especies bacterianas. Sin embargo, ninguno de los extractos de las tres especies vegetales tuvo actividad antifúngica.
- La composición química de *A. mollis* varió en los dos años de colecta en cuanto a la presencia de alcaloides, terpenos y saponinas.
- El extracto metanólico de *A. mollis* 2018 contiene la mayor diversidad de metabolitos secundarios y fue el más activo ya que presentó las menores CMI (*S. aureus* CMI= 1.5 mg/mL y *S. epidermidis* CMI=0.37 mg/mL).
- El fraccionamiento biodirigido de los extractos hexánicos y acetónicos de *A. mollis* 2018 demuestran que la planta es rica en metabolitos terpénicos con actividad antibacteriana. Además del extracto hexánico se purificaron cristales también de naturaleza terpénica, los cuales exhibieron actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.
- El fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico *A. mollis* 2018 demostró que las fracciones presentaron menor actividad antibacteriana en comparación con el extracto completo, lo que sugiere un efecto sinérgico.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesina, S. K., Idowu, O., Ogundaini, A. O., Oladimeji, H., Olugbade, T. A., Onawunmi, G. O., & Pais, M. (2000). Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research*, 14(5):371-374. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<371::AID-PTR625>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<371::AID-PTR625>3.0.CO;2-F)
- Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z., & Shafiq, H. (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Research International*, 77:221–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.021>
- Ahmed, F. & Urooj, A. (2011). Pharmacognostical studies on *Ficus racemosa* stem bark. *Pharmacognosy Journal*, 3(19):19-24. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.19.4>
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., & Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(4), 487–491. <https://doi.org/10.1093/jac/48.4.487>
- Alqasoumi, S. I., Basudan, O. A., Al-Rehaily, A. J., & Abdel-Kader, M. S. (2014). Phytochemical and pharmacological study of *Ficus palmata* growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(5):460-471. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.010>
- Álvarez-Santos, N. (2019). Evaluación de las propiedades antioxidante y cicatrizante de algunas plantas medicinales utilizadas en el valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Mexico. 110 pp.
- Anbukkarasi, M. (2012). A study on antimicrobial activity of *Acalypha indica* crude extraction of methanolic compound. *International Journal of Current Science*, 2012:282-286.
- Anokwuru, C. P., Sinisi, A., Samie, A., & Taglialatela-Scafati, O. (2015). Antibacterial and antioxidant constituents of *Acalypha wilkesiana*. *Natural Product Research*, 29(12):1180-1183. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.983105>

- Ao, C., Deba, F., Tako, M., & Tawata, S. (2009). Biological activity and composition of extract from aerial root of *Ficus macrocarpa* L. fil. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2):349-358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01732.x>
- Baumgartner, B., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T., & Sticher, O. (1990). An antimicrobial alkaloid from *Ficus septica*. *Phytochemistry*, 29(10):3327-3330. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80209-y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80209-y)
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pérez-Pacheco, N. O., Álvarez-Sandoval, J. H., & Giraldo-Aristizabal, C. I. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1):31-40. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3597>
- Betancourt, L., Phandanavong, V., Patiño, R., Ariza-Nieto, C., & Afanador-Téllez, G. (2012). Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *origanum* and *lippia* genus. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(1):21-31.
- Betti, J.L., (2004). An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka Pygmies in the biosphere reserve, Cameroon. *African Study Monographs*, 25:1-27.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009a). Hierba del cáncer. *Acalypha adenostachya* Muell. Arg. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Fecha de consulta 15 de julio del 2021. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=acalypha-adenostachya>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009b). Hierba del cáncer o hierba del golpe. *Acalypha indica* (Muell. Arg.) Pax & Hoffm. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Fecha de consulta 15 de julio del 2021. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=acalypha-indica>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009c). Koopo. *Ficus cotinifolia* Kunth. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Fecha de consulta 22 de febrero del 2021. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t= ficus-cotinifolia>

- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009d). Saiba amarilla. *Ficus petiolaris* Kunt. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Fecha de consulta 22 de febrero del 2021. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=ficus-petiolaris>
- Bitschar, K., Staudenmaier, L., Klink, L., Focken, J., Sauer, B., Fehrenbacher, B., Herster, F., Bittner, Z., Bleul, L., Schaller, M., Wolz, C., Weber, A. N., Peschel, A., & Schitteck, B. (2020). *Staphylococcus aureus* skin colonization is enhanced by the interaction of neutrophil extracellular traps with keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(5):1054-1065.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.10.017>
- Bouarab-Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4):1457-1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Boucher, H., Talbot, G., Bradley, J., Edwards, J., Gilbert, D., Rice, L., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1):1-12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Braz, M., Salvador, D., Gomes, A. T. P. C., Mesquita, M. Q., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., & Almeida, A. (2020). Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on skin using a porphyrinic formulation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30:101754. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101754>
- Burapadaja, S., & Bunchoo, A. (1995). Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica*, 61(04):365-366. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958103>
- Camacho, D. V., & Hernández, C. J. L. (2009). Migración internacional y desarrollo local en Tonatico. Corte Interamericana de Derechos Humanos. Recurso electrónico. Fecha de consulta 23 de mayo del 2019. <http://www.corteidh.or.cr/tablas/r29118.pdf>
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, Á., & Lira, R. (2006). Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botanica Mexicana*, 75:21-43. <https://doi.org/10.21829/abm75.2006.1013>

- Canales, M., Hernández, T., Rodríguez-Monroy, M., Flores, C., Jiménez-Estrada, Hernández, L., Durán, A., Hernández-Moreno, M., Trejo, N., Hernández, A., Ramírez, J., Orozco, J., Eleno, M., & Martínez, K., (2011). Evaluation of the antimicrobial activity of *Acalypha monostachya* Cav. (Euphorbiales: Euphorbiaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(5):640-647. <https://doi.org/10.5897/ajpp10.226>
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23:1-11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Cisneros, J. M., Pérez-Moreno, M. A., & Gil-Navarro, M. V. (2014). Política de antibióticos. Comisión de Infecciones y uso de antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(8):533-536. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.01.008>
- CLSI (2018a). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (11° edition.). CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CLSI (2018b). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* (13° edition.). CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CONABIO. 2006. Capital natural y bienestar social. Editor Antonio Bolívar. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Corralo, D. S., de las Heras-Alonso, M. E., & Acebes, L. O. (2014). Infecciones cutáneas. *Medicine*, 11(47):2755-2763. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(14\)70694-8](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(14)70694-8).
- Coy-Barrera, C. A., Parra, J., & Cuca Suárez, L. E. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *rputia heptaphylla* (rutaceae). *Elementos*, 4(4):31-39. <https://doi.org/10.15765/e.v4i4.513>
- Darwish, R. S., Shawky, E., Hammada, H. M., & Harraz, F. M. (2020). A new thin-layer chromatography–direct bioautography assay for the qualitative and quantitative determination of peroxidase inhibitors in plant extracts. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 33(1):3-9. <https://doi.org/10.1007/s00764-019-00004-0>

- Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM). 2014. *Acalypha mollis* Kunth, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Fecha de consulta 22 de julio del 2021. <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:76033>
- Dehghan, H., Rezaee, P., & Aliahmadi, A. (2020). Bioassay screening of 12 Iranian plants and detection of antibacterial compounds from *Heracleum persicum* using a TLC bioautography method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 43(11-12):381-387. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1725557>
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2):75-84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents, and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10:S1193-S1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>
- Din, W. M., Jin, K. T., Ramli, R., Khaithir, T. M. N., & Wiert, C. (2013). Antibacterial Effects of Ellagitannins from *Acalypha wilkesiana* var. *macafeana* hort.: Surface Morphology Analysis with Environmental Scanning Electron Microcopy and Synergy with Antibiotics. *Phytotherapy Research*, 27(9):1313–1320. <https://doi.org/10.1002/ptr.4876>
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. Ed. Limusa. Mexico. 208 p.
- Domínguez, X. A. (1980). *Experimentos de Química Orgánica*. Ed. Limusa. México. 203 p.
- Emeka, P. M., Badger-Emeka, L. I., & Fateru, F. (2012). *In vitro* antimicrobial activities of *Acalypha ornate* leaf extracts on bacterial and fungal clinical isolates. *Journal of Herbal Medicine*, 2(4), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.09.001>
- Farha, M. A., & Brown, E. D. (2016). Strategies for target identification of antimicrobial natural products. *Natural Product Reports*, 33(5):668-680. <https://doi.org/10.1039/c5np00127g>

- Fawzy, G. A., Al-Taweel, A. M., Perveen, S., Khan, S. I., & Al-Omary, F. A. (2017). Bioactivity and chemical characterization of *Acalypha fruticosa* Forssk. growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(1):104-109. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.05.004>
- Fongang, Y. S. F., Bankeu, J. J. K., Ali, M. S., Awantu, A. F., Zeeshan, A., Assob, C. N., Mehreen, L., Lenta, B. N., Ngouela, S. A., & Tsamo, E. (2015). Flavonoids and other bioactive constituents from *Ficus thonningii* Blume (Moraceae). *Phytochemistry Letters*, 11:139-145. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.11.012>
- Foulger, J. H. (1931). The use of the Molisch ( $\alpha$ -naphthol) reactions in the study of sugars in biological fluids. *Journal of Biological Chemistry*, 92(2):345–353. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)76522-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)76522-8)
- Frenk, J., Gómez-Dantés, O., & Knaul, F. M. (2011). Globalization and infectious diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 25(3):593-599. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2011.05.003>
- Gaire, B. P., Lamichhane, R., Sunar, C. B., Shilpakar, A., Neupane, S., & Panta, S. (2011). Phytochemical screening and analysis of antibacterial and antioxidant activity of *Ficus auriculata* (Lour.) Stem Bark. *Pharmacognosy Journal*, 3(21):49-55. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.21.8>
- García-Bores, A. M., Álvarez-Santos, N., López-Villafranco, M. E., Jácquez-Ríos, M. P., Aguilar-Rodríguez, S., Grego-Valencia, D., Espinosa-González, A. M., Estrella-Parra, E. A., Hernández-Delgado, C. T., Serrano-Parrales, R., González-Valle, M. D. R., & Benítez-Flores, J. D. C. (2020). *Verbesina crocata*: A pharmacognostic study for the treatment of wound healing. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11):3113–3124. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.038>
- GBIF Secretariat. (2021a). *Ficus cotinifolia* Kunth. Fecha de consulta 20 de julio del 2021. <https://www.gbif.org/species/7262403>
- GBIF Secretariat. (2021b). *Ficus petiolaris* Kunth. Fecha de consulta 20 de julio del 2021. <https://www.gbif.org>
- Gertsch, J. (2011). Botanical Drugs, Synergy, and Network Pharmacology: Forth and Back to Intelligent Mixtures. *Planta Medica*, 77(11):1086-1098. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270904rg/species/7262350>

- Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21(2): 263-277. <https://doi.org/10.1039/b212695h>
- González-Castañeda, N., Cornejo-Tenorio, G., & Ibarra-Manríquez, G. (2010). El género *Ficus* (Moraceae) en la Provincia Biogeográfica de la Depresión del Balsas, México. *Botanical Sciences*, 87:105-124. <https://doi.org/10.17129/botsci.318>
- Guadarrama-Martínez, N.; Rubí-Arriaga, M.; González-Huerta, A.; Vázquez-García, L. M.; Martínez-De La Cruz, I.; López-Sandoval, J. A. & Hernández-Flores, G. V. (2012). Inventario de árboles y arbustos con potencial ornamental en el sureste del Estado de México. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 81:221-228.
- Gutierrez-Lugo, M.-T., Singh, M. P., Maiese, W. M., & Timmermann, B. N. (2002). New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communis*. *Journal of Natural Products*, 65(6):872-875. <https://doi.org/10.1021/np020044g>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12)1-24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Hossain, M. A. (2019). A review on *Ficus sycomorus*: A potential indigenous medicinal plant in Oman. *Journal of King Saud University Science*, 31(4):961-965. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.07.002>
- Hotez, P. J., & Gurwith, M. (2011). Europe's neglected infections of poverty. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(9):e611-e619. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.05.006>
- Ibarra-Manríquez, G., Cornejo-Tenorio, G., González-Castañeda, N., Piedra-Malagón, E. M., & Luna, A. (2012). El género *Ficus* I. (moraceae) en México. *Botanical Sciences*, 90(4):389. <https://doi.org/10.17129/botsci.472>
- Javed, A. (2016). Edge of herbal preparations for skin regeneration over synthetic ointments. *International Journal of Recent Scientific Research*, 7(8):13012-13017
- Jorcano, N. J. L. (2009). Aplicaciones biotecnológicas: Aplicaciones preclínicas y clínicas de piel generadas a partir de células madre epidérmicas. En: Dávila, F de P. & Cascales, M. (eds) *Células Madre y Terapia regenerativa*. Real Academia Nacional de Farmacia. España. 223-257 pp.

- Khatoon, S., Singh, S., Singh, M., Kumar, V., Rawat, A. S., & Mehrotra, S. (2010). Antimicrobial screening of ethnobotanically important stem bark of medicinal plants. *Pharmacognosy Research*, 2(4):254-257. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.69127>
- Ki, V., & Rotstein, C. (2008). Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A Review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 19(2):173-184. <https://doi.org/10.1155/2008/846453>
- Kocaçalışkan, I., Talan, I., & Terzi, I. (2006). Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(9-10):639-642. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-9-1004>
- Kuete, V., Nana, F., Ngameni, B., Mbaveng, A. T., Keumedjio, F., & Ngadjui, B. T. (2009). Antimicrobial activity of the crude extract, fractions, and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3):556-561. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.003>
- Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C. C. F., Tankeu, R. K., Ngadjui, B. T., Meyer, J. J. M., Lall, N., & Kuate, J. R. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1):17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.026>
- Lamikanra, A., Ogundaini, A. O., & Ogungbamila, F. O. (1990). Antibacterial constituents of *Alchornea cordifolia* leaves. *Phytotherapy Research*, 4(5):198-200. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650040508>
- Lansky, E. P., Paavilainen, H. M., Pawlus, A. D., & Newman, R. A. (2008). *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2):195-213. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.025>
- Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C. N., Tang, G. Y., & Li, H. B. (2017). Antibacterial and antifungal activities of spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6):1283. <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>
- Luna-Céspedes, R. 2014. Flora de las barrancas de Tonatico, Estado de México, México. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 111 pp

- Macedo, M.; Algorta, G.; Vola, M. & Pardo, L. (2006). Bacteriemias y sepsis. Endocarditis. En: Schelotto, F. (Ed.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Facultad de medicina. Instituto de higiene oficina del libro-FEFMUR. (2° edición). Montevideo, Uruguay. 197-211.
- Macola, O. S. (2001). *Candida*. En Llop, H. A.; Valdéz-Dapana, V. & Zuazo, S. J. L. (Eds). *Microbiología y Parasitología Medicas*. Editorial de Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana. 501-507 pp
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. & Stahl, D. A. (2019). *Brock biology of microorganisms*. (15° edition). Editorial Pearson. New York. 544 pp.
- Mandal, S. C., Saha, B. P., & Pal, M. (2000). Studies on antibacterial activity of *Ficus racemosa* Linn. leaf extract. *Phytotherapy Research*, 14(4):278-280. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200006\)14:4<278::AID-PTR592>3.0.CO;27](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200006)14:4<278::AID-PTR592>3.0.CO;27)
- Martínez, I. A. y Pérez, A. J. (2001). Estafilococos. En Llop, H. A.; Valdéz-Dapana, V. & Zuazo, S. J. L. (Eds). *Microbiología y Parasitología Medicas*. Editorial de Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana. 153-163 pp
- Martínez-Gordillo, M., Jiménez-Ramírez, J., Cruz-Durán, R., Juárez-Arriaga, E., García, R., Cervantes, A., & Mejía-Hernández, R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 73(2), 155-281
- Marrez, D. A., El Raey, M. A., El-Hagrassi, A. M., Seif, M. M., Ragab, T. I. M., El Negoumy, S. I. & Emam, M. (2017). Phenolic profile and antimicrobial activity of green synthesized *Acalypha wilkesiana* seeds silver nanoparticles against some food borne pathogens. *Bioscience Research*, 14(4):817-830
- Mesa, A. A. C & Bueno, S. J. G. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(4):325-331
- Morens, D. M. Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2008). Emerging infections: a perpetual challenge. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(11):710-719. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(08\)70256-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(08)70256-1)
- Nair, S. y Chanda, V. (2007). Antibacterial activities of some medicinal plants of the western region of India Rathish. *Turkish Journal Of Biology*, 31:231-236.

- Noumedem, J. A. K., Tamokou, J., Teke, G., Momo, R. C. D., Kuete, V., & Kuate, J. (2013). Phytochemical analysis, antimicrobial, and radical-scavenging properties of *Acalypha manniana* leaves. *SpringerPlus*, 2(1):503. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-503>
- Oluduro, A. O., Bakare, M. K., Oomoboye, O. O., Dada, C. A. & Olatunji, C. I. (2011). Antibacterial effect of extracts of *Acalypha wilkesiana* on gastrointestinal tract pathogens and bacteria causing skin Infections in neonates. *Ife Journal of Science*, 13(2):371-380
- Oyedemi, B. O., Oyedemi, S. O., Chibuzor, J. V., Ijeh, I. I., Cooposamy, R. M. & Aiyegoro, A. O. (2018). Pharmacological evaluation of selected medicinal plants used in the management of oral and skin infections in Ebem-Ohafia District, Abia State, Nigeria. *The Scientific World Journal*, 2018:1-16. <https://doi.org/10.1155/2018/4757458>
- Pontón, J., & Quindós, G. (2006). Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Medicina Clínica*, 126:56-60. <https://doi.org/10.1157/13097528>
- Pommerville, J. C. (2010). *Alcamo's Fundamentals of Microbiology* (9<sup>o</sup> edition) Jones & Bartlett Pub. Massachusetts, USA. 414-426 pp
- Porfírio, E. M., Melo, H. M., Pereira, A. M. G., Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., Carvalho, M. G. D., Costa, R. A., & Júnior, F. E. A. C. (2017). *In Vitro* antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. *The Scientific World Journal*, 2017:1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/4962707>
- Pragada, R. & Vangepurapu, V. & Ethadi, S. & Dasari, Praneeth. (2011). Phytochemical investigation and in vitro Antioxidant, Antimicrobial activity of different fractions of *Acalypha indica* linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4):314-317.
- Prashantkumar, P. & Vidyasagar, G. M. (2008). Traditional knowledge on medicinal plants used for the treatment of skin diseases in Bidar District, Karnataka. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 7(2):273-276
- Radulovic, N. S., Blagojevic, P. D., Stojanovic-Radic, Z. Z., & Stojanovic, N. M. (2013). Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry* 20(7):932-952. <https://doi.org/10.2174/092986713805219136>

- Ramírez-Hernández, B. C., Robles-Arellano, G., García de Alba-García, J. E., Zañudo-Hernández, J., Salcedo-Rocha, A. L., & García de Alba-Verduzco, J. (2013). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos. Revista de Ciencias Sociales*, 39:29-44. <https://doi.org/10.29340/39.238>
- Rengifo-Penadillos, R. (2013). Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Revista Farmaciencia*, 2(1):51-56
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica (Spanish Edition)*. OmniaScience. Nuevo León, México. 436 pp
- Roye, R.; Meléndez, M.; Ruiz, G.; Gamboa, A. & Morantes, J. (2006). Enfermedades dermatológicas en la edad pediátrica Hospital Militar “Dr. Carlos Arvelo”, 2005-2006, Caracas, Venezuela. *Dermatología Venezolana*. 44(4):12-16.
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7(8):979-990. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12):3875-3883
- Schmelzer, G. H. & Gurib-Fakim, A. (2008). Plant Resources of Tropical Africa 11(1). Medicinal Plants 1. PROTA Foundation, Eaggeningen, Netherlands/ Backhuys Publishers, Leiden, Netherland/ CTA. Wageningen, Netherlands. 791 pp
- Seebaluck, R., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, F. (2015). Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)—A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 159:137-157. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.040>
- Seebaluck-Sandoram, R., Lall, N., Fibrich, B., van Staden, A. B., & Mahomoodally, F. (2018). Antibiotic-potentiating activity, phytochemical profile, and cytotoxicity of *Acalypha integrifolia* Willd. (Euphorbiaceae). *Journal of Herbal Medicine*, 11:53-59. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.03.005>
- Selvamani, S., & Balamurugan, S., (2015). Phytochemical screening and GC-MS analysis of acetone leaf extract of *Acalypha indica* (Linn.). *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 3(5):229-232

- Semwal, A., Kumar, R., Teotia, U. V. S., & Singh, R. (2013). Pharmacognostical evaluation of medicinally important *Ficus retusa* (Leaves and bark). *Journal of Acute Disease*, 2(4):300-303. [https://doi.org/10.1016/s2221-6189\(13\)60148-1](https://doi.org/10.1016/s2221-6189(13)60148-1)
- Seija, V. (2006). Género *Staphylococcus*. En: Pérez, M. & Mota, M. (eds). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Facultad de medicina. Instituto de higiene oficina del libro-FEFMUR. (2° edición). Montevideo, Uruguay. 257-271 pp.
- Serrano-Parrales, R. (2013). Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Mexico. 121 pp.
- Sharma, A., Flores-Vallejo, R. C., Cardoso-Taketa, A., & Villarreal, M. L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 208:264-329. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
- Smith, K. M., Machalaba, C. C., Seifman, R., Feferholtz, Y., & Karesh, W. B. (2019). Infectious disease and economics: The case for considering multi-sectoral impacts. *One Health*, 7(100080):1-6. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2018.100080>
- Solomon, R. D. J., Kallidass, S., & Vimalan, J. (2005). Isolation, identification, and study of antimicrobial property of a bioactive compound in an Indian medicinal plant *Acalypha indica* (Indian-Nettle). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7):1231-1236. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-1479-6>
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Navales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2):136-141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>
- Soruba, E., Sundaram, V., Manian, R. P., Kulanthaivelu, K. & Sridharan, B. (2015). Antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activity of *Acalypha indica* and *Terminalia chebula*: an *in-vitro* analysis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(3):180-188.
- Subbarayan, G., Krishnasami, S. & Jeyaseelan, D. E. (2010). Chemical investigation of aerial parts of *Acalypha fruticosa* forssk. *DER PHARMA CHEMICA*, 2(5):383-389.

- Tabassum, N., & Hamdani, M. (2014). Plants used to treat skin diseases. *Pharmacognosy Reviews*, 8(15):52. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125531>
- Takle, V. V., Savad, R. V., Kandalkar, A. M., Akarte, A. M., & Patel, A. M. (2011). Pharmacognostic and Phytochemical investigations of aerial parts of *Acalypha indica* Linn. *Pharmacognosy Journal*, 3(21):33-35. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.21.6>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134 (103580):1-20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Teklani P. W. N. N. & Perera, B. G. K. (2016). The important biological activities and phytochemistry of *Acalypha indica*. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 6(1):30-35.
- Tomás-Menor, L., Barrajon-Catalán, E., Segura-Carretero, A., Martí, N., Saura, D., Menéndez, J. A., Joven, J., & Micol, V. (2015). The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics?. *Phytotherapy Research*, 29(3):466–473. <https://doi.org/10.1002/ptr.5296>
- Top, S. M., Preston, C. M., Dukes, J. S., & Tharayil, N. (2017). Climate Influences the Content and Chemical Composition of Foliar Tannins in Green and Senesced Tissues of *Quercus rubra*. *Frontiers in Plant Science*, 8(423):1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00423>
- Ullah, N., Parveen, A., Bano, R., Zulfiqar, I., Maryam, M., Jabeen, S., Liaqat, A., & Ahmad, S. (2016). *In vitro* and *in vivo* protocols of antimicrobial bioassay of medicinal herbal extracts: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(8):660-667. [https://doi.org/10.1016/s2222-1808\(16\)61106-4](https://doi.org/10.1016/s2222-1808(16)61106-4)
- Universidad Autónoma de Querétaro. (sf). Biología. *Acalypha mollis* Kunth. Fecha de consulta 19 de julio del 2021. [http://bio.uaq.mx/municipioQro/fichas.php?idA=568&n\\_img=1&F=1](http://bio.uaq.mx/municipioQro/fichas.php?idA=568&n_img=1&F=1)
- Vallejo, V. E., Yanine, H., & Roldan, F. A. (2010). Aplicación de sales de tetrazolio de nueva generación (xtt) para la estimación de la densidad de microorganismos

- degradadores de hidrocarburos en suelos de la ecorregión cafetera colombiana. *Acta Biológica Colombiana*, 15(3):75-90.
- Verma, S. 2016. Medicinal plants used in cure of skin diseases. *Advances in Applied Science Research*. 7(3):65-67.
- Vidaurre-Martínez, M., Querevalú-García, L., De los Rios-Martinez, E., & Ruiz Reyes, S. (2019). Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Vallejian Medical Journal*, 4(2):121–131. <https://doi.org/10.18050/revistamedicavallejiana.v4i2.2235>
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3):559-902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Ying-Tsun, M., Jin-I, C., Jer-Huei, L. & Feng-Lin, H. (1997). Phenolics from *Acalypha indica*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 44:499-502
- Wagner, H. (2001). Plant drug analysis A thin layer chromatography atlas. Second Edition. Springer Germany. 6:344-350 pp.
- Wagner, H. (2011). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 82(1):34-37. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.016>
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3):97-110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Wang, H., & Ng, T. B. (2002). Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*, 61(1):1-6. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00144-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00144-9)
- Wang, Y., Liang, H., Zhang, Q., Cheng, W., & Yi, S. (2014). Phytochemical and chemotaxonomic study on *Ficus tsiangii* Merr. ex Corner. *Biochemical Systematics and Ecology*, 57:210-215. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.08.003>
- World Health Organization. (2015, 8 septiembre). OMS | Enfermedades infecciosas. Organización Mundial de la Salud. Consultado el 21 de abril del 2020. [https://www.who.int/topics/infectious\\_diseases/es/](https://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/)

- Zahidin, N. S., Saidin, S., Zulkifli, R. M., Muhamad, I. I., Ya'akob, H., & Nur, H. (2017). A review of *Acalypha indica* L. (Euphorbiaceae) as traditional medicinal plant and its therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 207:146-173. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.019>
- Zavala, M. S., Pérez, S. G., & Pérez, C. G. (2008). Study of the gastrointestinal properties of *Acalypha* aff. *mollis*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 10(4):63-71. [https://doi.org/10.1300/j044v10n04\\_07](https://doi.org/10.1300/j044v10n04_07)

## 12. ANEXOS

### Anexo I Detección cualitativa de grupos de metabolitos secundarios

#### Alcaloides (Domínguez, 1973)

Las técnicas de reconocimiento están basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados. (Coy-Barrera *et al.*, 2014).

Para la detección de alcaloides se utilizó 1 mg de extracto disuelto en 1 mL de solvente, este se colocó en un tubo de ensayo. Posteriormente se agregaron 500 µL de reactivo del reactivo correspondiente (Dragendorff o Mayer).

- **Reactivo de Dragendorff:** se prepara mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico al 30 % con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se deja en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo (Coy-Barrera *et al.*, 2014).

Con el reactivo de Dragendorff muchos alcaloides presentes en extractos vegetales forman con el bismuto, yoduros dobles insolubles de fórmula general  $Bil_3 \cdot HI$ .

- **Reactivo de Mayer:** se prepara disolviendo 1.3 g de bicloruro de mercurio en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 mL. Los alcaloides se detectan como un precipitado color lanco o crema.

Con el reactivo de Mayer el yoduro de potasio cuando reacciona con cloruro de mercurio forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico:  $[HgCl_2 + 2I^- \rightarrow 2Cl^- + HgI_2]$  soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro:  $HgI_2 + I^- \rightarrow HgI_4^{2-}$ . La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco, ante este reactivo (Coy-Barrera *et al.*, 2014).

#### Terpenos

- **Vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Wagner, 2001):** para la detección de monoterpenos se utilizó CCF. Los cromatofolios se asperjaron con solución de vainillia al 1% en etanol, posteriormente se asperjaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% disuelto en etanol. Después se

calentaron en una parrilla a 110°C durante 5-10 min bajo observación. La presencia de coloraciones rosas o moradas se considera un resultado positivo a monoterpenos.

- **Liebermann-Burchard (Rivas-Morales et al., 2016):** Para esta reacción se utilizaron 1 mg de extracto disuelto en 1 mL de solvente, esto se colocó en un tubo de ensayo y se adiciono 1 mL de cloroformo y 1 mL de anhídrido acético y se dejó reposar en frío 5 min. Posteriormente se adiciono 3-6 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un color azul o morado es prueba positiva para esteroides y color rojizo para triterpenos.

La reacción de Liebermann-Burchard es típica de los esteroides y triterpenos que contienen dos dobles enlaces conjugados en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o un doble enlace de un anillo adyacente con un grupo hidroxilo. La reacción debe realizarse en un medio absolutamente anhidro, ya que al existir moléculas de agua estas reaccionan con el anhídrido acético, anulando de esta manera la reacción con el núcleo esteroide o triterpenoide. El diclorometano solubiliza a la muestra favoreciendo la captación de alguna molécula de agua presente y el ácido sulfúrico, favorece la deficiencia electrónica del anhídrido acético, el cual es estabilizado por los electrones de los dobles enlaces (dienos) conjugados, dando de esta manera la coloración respectiva (Vidaurre-Martínez et al., 2007).

### **Compuestos fenólicos generales (Rivas-Morales et al., 2016)**

Para esta prueba se utilizó 1 mg de extracto disuelto en 1 mL de solvente, este se colocó en un tubo de ensayo, posteriormente se les adiciono 2-4 gotas de cloruro férrico al 2.5% en etanol. La coloración verde oscura o negra es prueba positiva.

Los compuestos fenólicos precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y formando un complejo con Fe(III), que es intensamente coloreado (Coy-Barrera et al., 2014).

### **Flavonoides**

- **Reacción con hidróxido de sodio (Rengifo-Penadillos, 2013):** para esta prueba se disolvió 1 mL de extracto en 1 mL de solvente y se colocó en un tubo de ensayo, posteriormente se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 20%, la aparición de una coloración amarilla se considera positiva.

La reacción con NaOH se produce la ruptura del anillo C de un flavonoide el cual puede ser de una flavona o de una flavanona, esta ruptura produce la formación de una chalcona lo que se evidencia con una coloración amarilla que puede variar en intensidad.

- **Shinoda (Rivas-Morales *et al.*, 2016):** Para esta reacción se utilizó 1 mg de extracto disuelto en 1 ml de solvente, este se colocó en un tubo de ensayo, a este se le agregaron 2-3 virutas de magnesio y 3-5 gotas de ácido clorhídrico concentrado procurando que resbalen por las paredes. Si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva, si aparecen otros colores como naranja, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas. En la reacción de Shinoda el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos al H<sub>2</sub>, que es eliminado en forma de gas y el MgCl<sub>2</sub>, que es el responsable de formar complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado (Vidaurre-Martínez *et al.*, 2007).

#### **Cumarinas (Wagner, 2001)**

Para prueba se utilizó CCF, las placas con extracto fueron eluidas. Una vez libre de solvente y posteriormente se asperja con una solución de KOH al 20% diluido en etanol. Posteriormente se observan bajo luz UV (365 nm) la coloración azul indica la presencia de cumarinas.

#### **Taninos (Serrano-Parrales, 2013)**

La detección de taninos consiste en dos fases, la primera es una determinación cualitativa de presencia o ausencia de fenoles para ello se efectúa la reacción de la sustancia o extracto a evaluar con cloruro férrico; la segunda consiste en determinar la presencia de taninos, al adicionar un reactivo de gelatina a la sustancia a evaluar.

Para esta prueba se utilizaron los mismos tubos de la prueba de compuestos fenólicos generales. A cada tubo de le adicionaron 2-6 gotas de reactivo de gelatina al 1%. La presencia de taninos se pone en evidencia por la formación de un precipitado.

#### **Saponinas (Domínguez, 1973)**

Para la prueba de saponinas se disolvió 1 mg de extracto en 1 mL de solvente en un tubo de ensayo, posteriormente se adiciono 1 mL de agua caliente y se agitó vigorosamente

durante 3-5 minutos La formación de espuma estable durante aproximadamente 30 minutos se considera como resultado positivo.

### **Glicósidos (Foulger, 1931 y García-Bores *et al.*, 2020)**

Para esta prueba se utilizó 1 mg de extracto disuelto en 1 mg de solvente, se colocó en un tubo de ensayo, se adicionaron 300  $\mu$ L de reactivo de Mayer el cual es  $\alpha$ -naftol al 5% en etanol, posteriormente se adicionaron 2-4 gotas de ácido sulfurico concentrado. La adición de este produce un color amarillo. Posteriormente el tubo se calienta a baño maría (aproximadamente a 80°C). La aparición de colores rojo a azul violeta en el tubo indica la presencia de glicósidos. La reacción del  $\alpha$ -naftol (Molisch) para los azúcares se ha descuidado como posible base para un método cuantitativo. Los colores violetas que se producen en la superficie de contacto del ácido sulfúrico concentrado y una solución de azúcar que contiene  $\alpha$ -naftol, los cuales suelen quedar oscurecidos por la carbonización.

## **Anexo II Técnica de difusión en agar o Kirby-Bauer (CLSI, 2018a)**

Para estudios epidemiológicos de resistencia y en los estudios de nuevos agentes antimicrobianos, el método estandarizado recomendado actualmente por el Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana del CLSI se basa en el método de difusión en disco.

Para esta prueba se utilizó como medio de cultivo AMH para las especies bacterianas y APD para las especies de levaduras. El agar se preparó según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas de Petri estériles las cuales se llenan con 20 mL de agar, estas placas se almacenaron en paquetes cerrados para evitar la deshidratación.

Se utilizaron discos estériles de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del No. 5 los cuales se prepararon 24 horas antes del experimento. Cada sensidiscos se impregnó con 2 mg de extracto disueltos en 10  $\mu$ L de solvente de su respectiva polaridad. Como control positivo para las especies bacterianas se impregnaron sensidiscos con 25  $\mu$ g de cloranfenicol, otros con 50  $\mu$ g de nistatina como control positivo de levaduras. Como control negativo se utilizaron disco con 10  $\mu$ L de solvente. Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se almacenan hasta su uso.

Para la preparación del inóculo se utilizó el método de cultivo en caldo (antes método de crecimiento). Primero se seleccionan al menos 3-5 colonias bien aisladas de un cultivo en placa de agar. Se tocó la parte superior de cada colonia con un asa de siembra estéril y se transfirió a un tubo que contenía 10 mL de un medio de cultivo líquido, CMH para bacterias y caldo Sabouraud para levaduras. Este tubo se incubo durante 18 a 24 horas, hasta alcanzar una turbidez equivalente a la de un estándar de 0,5 McFarland. esto da como resultado una suspensión que contiene aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL.

Una vez logrado el estándar de crecimiento se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión microbiana, se giró varias veces el hisopo presionando firmemente en la pared interior del tubo para eliminar el exceso de líquido.

Se inocularon las placas Petri extendiendo el hisopo por toda la superficie de agar estéril. Se repite este procedimiento extendiendo 2 veces más, girando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo y al final se limpia el borde el agar. Se deja la tapa de la placa entreabierto durante (idealmente) 3-5 minutos para absorber el exceso de humedad de la superficie antes de aplicar los discos.

Posteriormente se colocaron los discos y se presionaron hacia abajo para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Los discos se distribuyeron uniformemente de forma que no estén más cerca de 24 mm de centro a centro prestando atención de no colocarlos demasiado cerca del borde de la placa.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, estas se invirtieron y se colocaron en una incubadora a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Cada placa se examinó después de incubar durante 16 a 18 horas. Los diámetros de las zonas de inhibición completa (a juzgar por el ojo sin ayuda), incluido el diámetro del disco, se midieron utilizando una regla sostenida en la parte posterior de la placa de Petri invertida. En todos los casos las pruebas se realizaron por triplicado y se reportara los valores promedio en  $\text{mm} \pm$  la desviación estándar.

### **Anexo III Técnica de inhibición del crecimiento radial de hongos (modificado de Wang y Ng, 2002).**

En el ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas Petri, las cuales contenían 30 ml de agar APD. Estas placas se almacenaron en paquetes cerrados para evitar la deshidratación.

Se inocularon 5 mm de diámetro del micelio del hongo *trichophyton mentagrophytes*. Una vez realizado este procedimiento se incubaron las placas a temperatura ambiente, durante dos semanas o hasta que el micelio comenzara a desarrollarse.

Se utilizaron discos estériles de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del No. 5 los cuales se prepararon 24 horas antes del experimento. Cada disco se impregnó con 2 mg de extracto disueltos en 10  $\mu$ L de solvente de su respectiva polaridad. También se impregnaron sensidiscos con 10  $\mu$ g de ketoconazol (control positivo) y otros con 10  $\mu$ L de solvente (control negativo). Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se almacenan hasta su uso.

Los discos se colocaron a 0.5 cm del del borde del micelio, posteriormente las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que el crecimiento micelial envolviera los discos que contenían el control negativo y formara medias lunas de inhibición alrededor de los discos que contenían el control positivo. Finalmente se midió el área de inhibición del crecimiento micelias. El resultado se reporta mm. En todos los casos las pruebas se realizaron por triplicado y se reportara los valores promedio en mm  $\pm$  la desviación estándar.

#### **Anexo IV Técnica de microdilución en caldo (CLSI, 2018b)**

Pueden usarse métodos de dilución en caldo o agar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano contra un aislado bacteriano dado. Para realizar las pruebas se preparan placas o una serie de tubos con un medio de agar o caldo al que se añaden diversas concentraciones de los agentes antimicrobianos.

En el presente trabajo se utilizó el método de microdilución en caldo, el cual se denomina así porque implica el uso de pequeños volúmenes de caldo dispensados en bandejas plásticas de microdilución estériles que tienen pocillos de fondo redondo o cónico.

Primero se preparó un inóculo bacteriano utilizando el método de cultivo en caldo (antes método de crecimiento) mencionado en el Anexo IV. Este se incubó durante 18 a 24 horas, hasta alcanzar una turbidez equivalente a la de un estándar de 0,5 McFarland. Esto da como resultado una suspensión que contiene aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL.

Según el manual M07 del CLSI, cada pocillo debe contener aproximadamente  $2-8 \times 10^5$  CFU/mL. Para ello se preparó otro inóculo a partir de la suspensión estándar de 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml), el cual se diluyó en solución salina (al 0.85% a 0.9% p/v). para que la concentración bacteriana de prueba final sea de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL (o  $5 \times 10^4$  UFC/pocillo en el método de microdilución).

El CLSI indica que es necesario realizar recuento de las colonias en suspensiones de inóculo. Los recuentos de colonias se realizaron tomando una alícuota de 0.01 mL del tubo de utilizado para el experimento, se diluyó en 10 mL de solución salina (dilución 1: 1000). Después de mezclarlo, se tomó una alícuota de 0.1 mL y se extendió sobre la superficie de una placa con AMH, la cual se incubó a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16–20 horas. Después de la incubación, la presencia de aproximadamente 50 colonias indica una densidad de inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC / mL.

Los extractos utilizados en el experimento se disolvieron en 1% de DMSO. Posteriormente se prepararon soluciones Stock de 3 mg/mL en CMH.

Se utilizaron placas de ELISA® de 96 posos estériles. Estas placas para la microdilución se prepararon según la Figura 13. En este experimento se hicieron cuatro repeticiones de cada tratamiento.

Se usaron tres controles de esterilidad (no contenían inóculo bacteriano):

- Columna 1: Medio estéril.
- Columna 2: Medio estéril con DMSO.
- Columna 3: Medio estéril con extracto (3 mg/mL).

Se usaron dos controles de crecimiento (contenían inóculo):

- Columna 4: Medio estéril.
- Columna 5: Medio estéril y DMSO.

Se uso un control negativo en la columna 6 que fue: medio estéril y cloranfenicol.

En la columna 7 se colocó el Stock de 3 mg/mL, en las columnas 8-12 se hicieron diluciones de los extractos en CMH estéril, las cuales fueron: 1.5, 0.75, 0.37, 0.18 y 0.9 mg/mL.

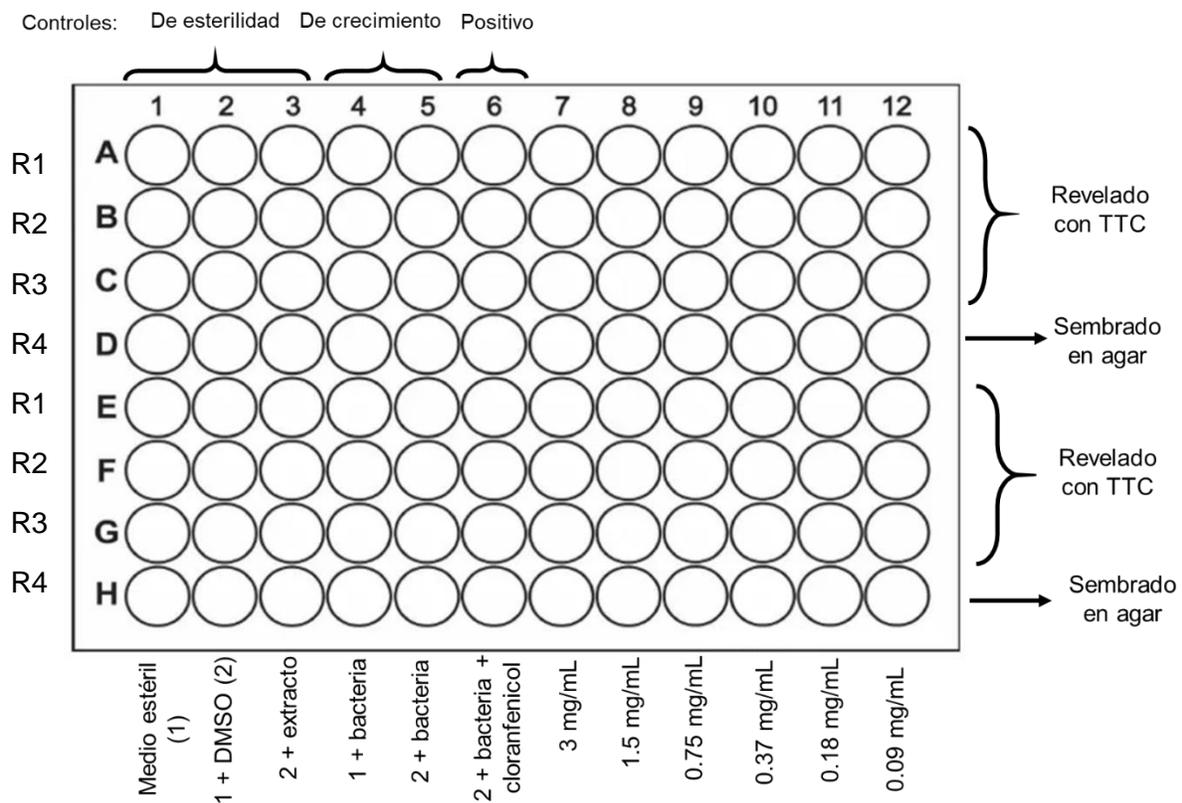


Figura 13. Representación esquemática de las placas ELISA® de 96 pozos utilizadas para la determinación de la CMI y la CBM de los extractos de *A. mollis* 2018.

Dentro de los 15 minutos posteriores a la dilución del inóculo, se agregó una cantidad conocida del inóculo a cada pocillo de las columnas 5-12. Para evitar que la placa se seque, esta se sella en una bolsa de plástico o con cinta plástica o con una cubierta de plástico hermética antes de incubar. Las placas se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 16–20 horas en una incubadora de aire ambiente dentro de los 15 minutos posteriores a la adición del inóculo.

Pasado este tiempo, a simple vista se compara la turbidez de los pozos con las diluciones y los controles, marcando la CMI como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento de organismos. Para corroborar los resultados, tres repeticiones se biorevelaron con TTC y se incurvaron durante 60 minutos para observar la intensidad de la coloración.

Para lograr la determinación de la Concentración mínima bactericida (CBM) fue necesario realizar un subcultivo. Se siembra por dispersión una cantidad conocida de cada pozo en placas de AMH. Se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. Se marca la CBM en la concentración menor requerida para eliminar una porción predeterminada del inóculo (en general, 99.9%).

## **Anexo V Técnica de bioautografía (modificado de Rivas-Morales *et al.*, 2016)**

El método de bioautografía es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas es colocado sobre una placa de CCF, posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto.

Para esta prueba se utilizó como medio de cultivo AMH, el cual se preparó según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas de Petri estériles las cuales se llenaron con 20 mL de agar, estas placas se almacenaron en paquetes cerrados para evitar la deshidratación.

Para cada extracto (o fracción) se utiliza una placa de aluminio cubierta con gel de sílice G60 de tres cm de ancho por diez cm de largo (o seis para el caso de las fracciones). Se sembró en forma de banda uniforme y se eluyó en la fase móvil que permitió la mejor separación, la cual se determinó previamente.

Una vez que la placa estaba seca se cortó de manera vertical con el fin de obtener tres (dos para el caso de las fracciones del extracto metanólico) placas de 1 cm de ancho. Dos placas se observan UV a 254 y 366 nm con reveladas con agentes cromógenos, para ello se asperjaron con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o la otra con sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se calientan en una parrilla de 1 a 2 minutos. La placa restante se utiliza en el bioensayo.

A partir de las bandas obtenidas en el revelado (con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) la placa restante se cortó en secciones, las cuáles fueron colocadas en cajas con AMH previamente inoculada con un hisopo estéril a partir de un inóculo bacteriano de aproximadamente 1-2x10<sup>8</sup> UFC/mL preparado con el método de cultivo en caldo (antes método de crecimiento). Estas placas se incubaron a 35°C ± 2°C durante 18 a 24 horas. De este tiempo se despegaron las placas y se asperjaron con TTC. Estas secciones se incubaron durante 15-60 minutos con el fin de observar donde se presentó crecimiento.

El TTC sirve para la visualización de crecimiento microbiano, estas sales permiten medir la actividad respiratoria asociada a la cadena transportadora de electrones. Presentan la ventaja de ser reducidas por la mayoría de los sistemas de deshidrogenasas y de requerir cortos periodos de tiempo para su reducción y consecuente cambio de color. Por consecuencia las zonas blancas en la placa de CCF indican una actividad antimicrobiana (Vallejo *et al.*,2010).

**Anexo VI Biorevelados de las fracciones del extracto hexánico**

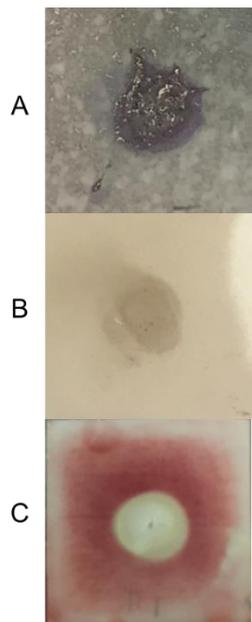


Figura 14. Biorevelado de la fracción H1 del EH.

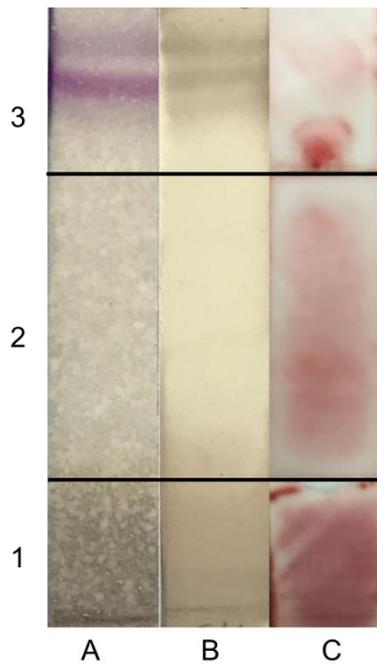


Figura 15. Biorevelado de la fracción H4 del EH.

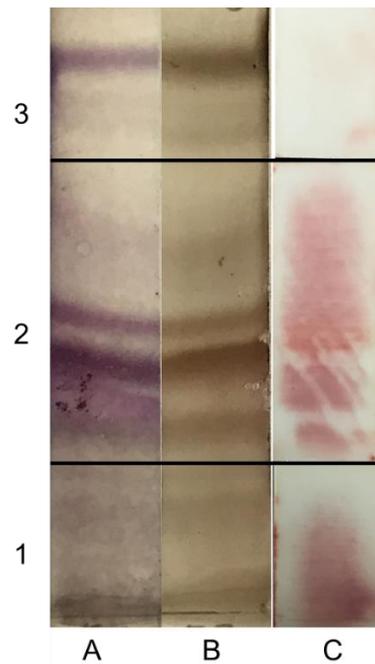


Figura 16. Biorevelado de la fracción H7.

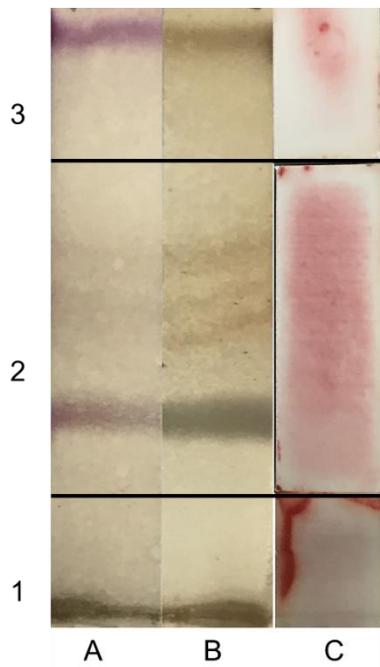


Figura 17. Biorevelado de la fracción H9.

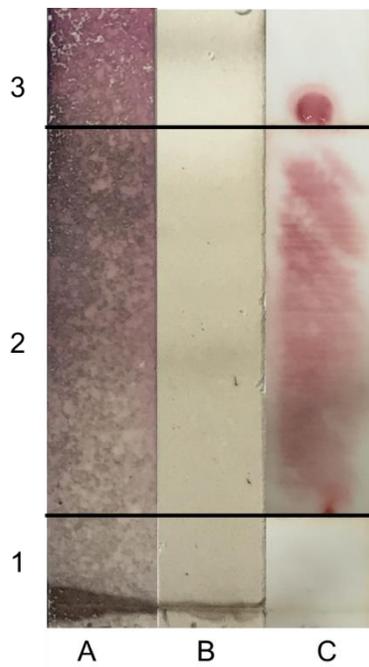


Figura 18. Biorevelado de la fracción H11.

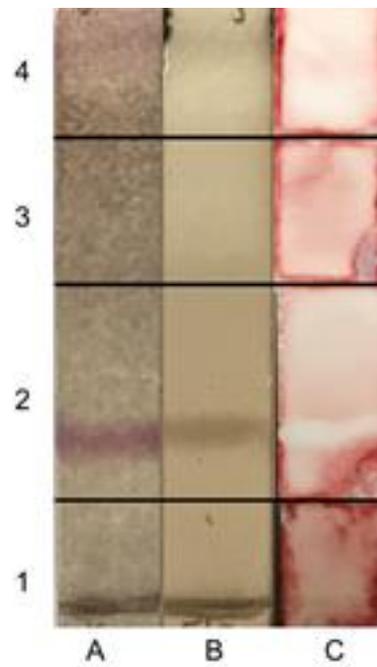


Figura 19. Biorevelado de la fracción H13.

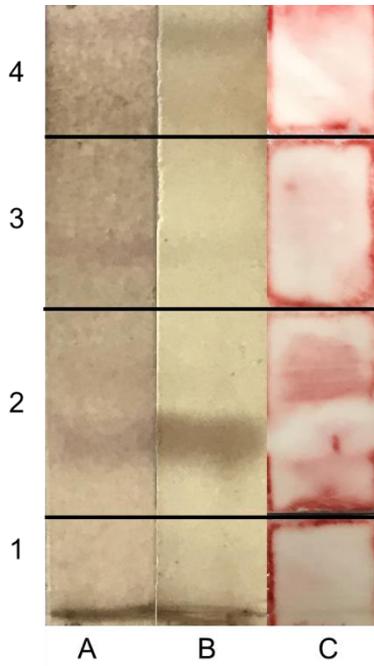


Figura 20. Biorevelado de la fracción H4.

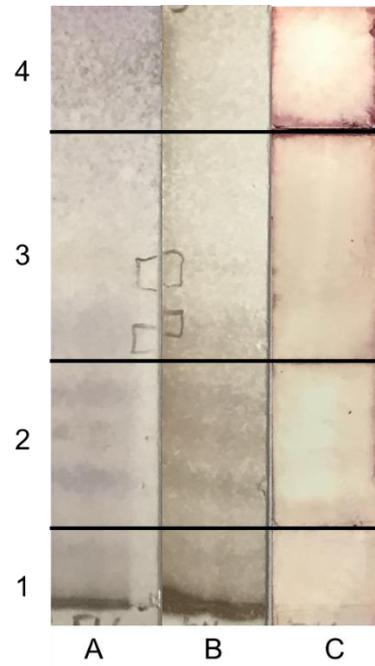


Figura 21. Biorevelado de la fracción H16.

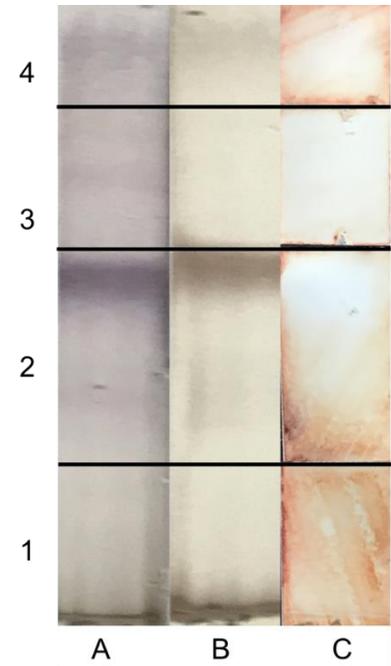


Figura 22. Biorevelado de la fracción H18.

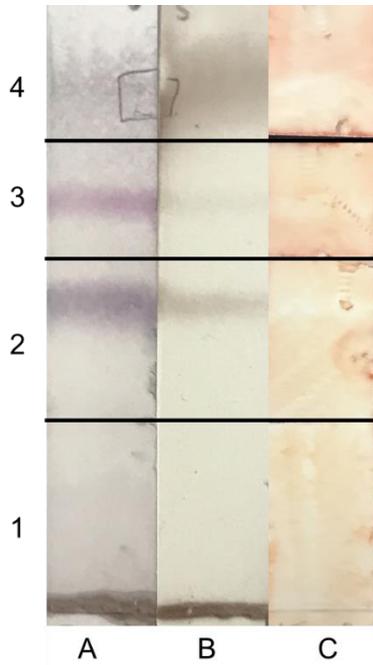


Figura 23. Biorevelado de la fracción H20.

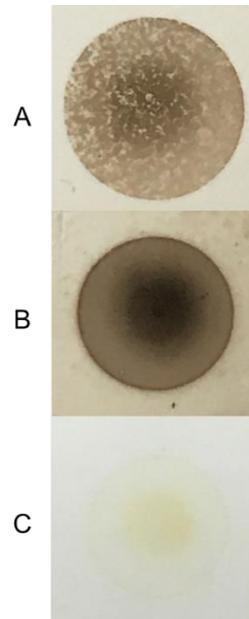


Figura 24. Biorevelado del precipitado PH3.

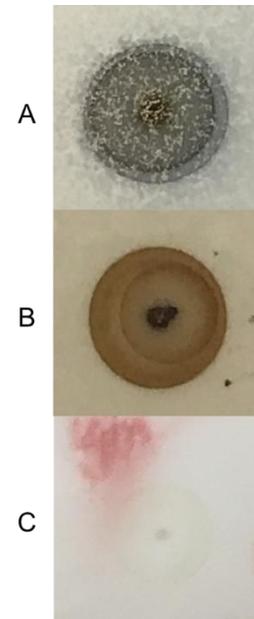


Figura 25. Biorevelado del precipitado PH7.

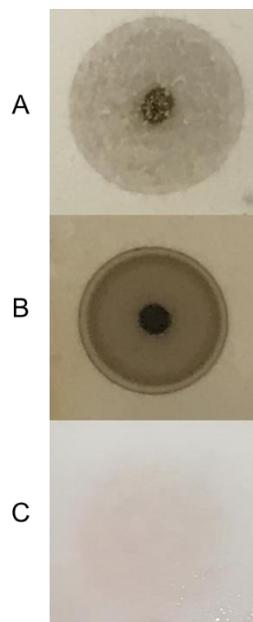


Figura 26. Biorevelado del precipitado PH8I.

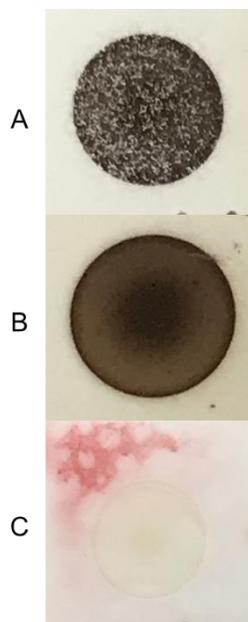


Figura 27. Biorevelado del precipitado PH8II.

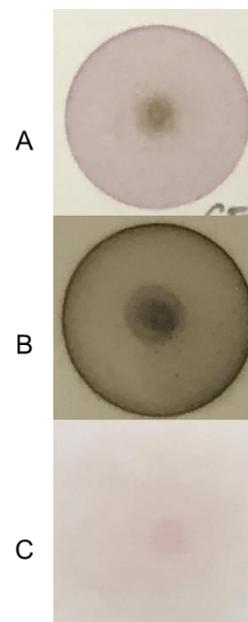


Figura 28. Biorevelado del sólido cristalino C9.



Figura 29. Biorevelado de los cristales B2.



Control positivo



Control negativo

Figura 30. Control positivo (cloranfenicol) y control negativo (hexano).

**Anexo VII Biorevelados de las fracciones del extracto acetónico**

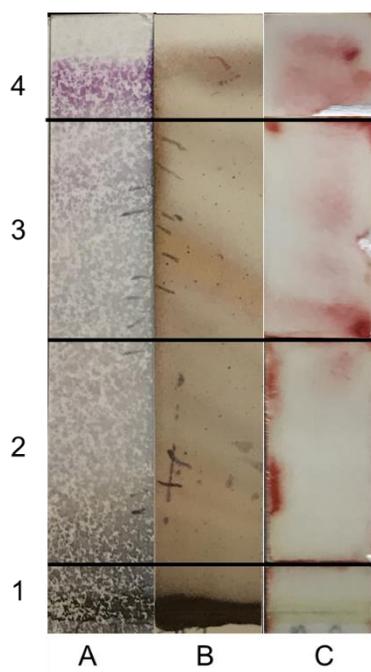


Figura 31. Biorevelado de la fracción A2.

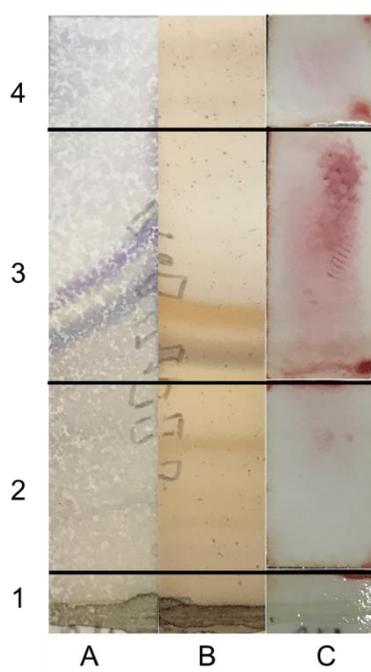


Figura 32. Biorevelado de la fracción A4.

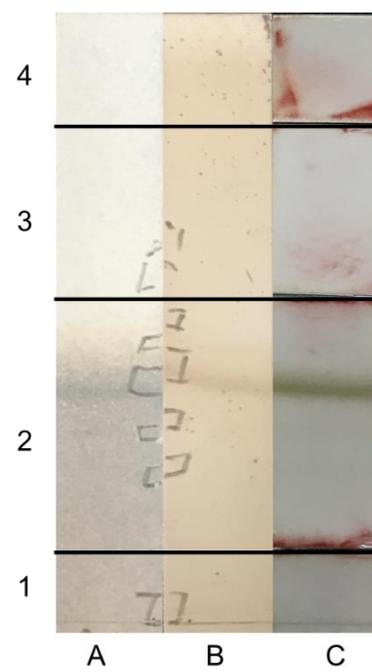


Figura 33. Biorevelado de la fracción A5.

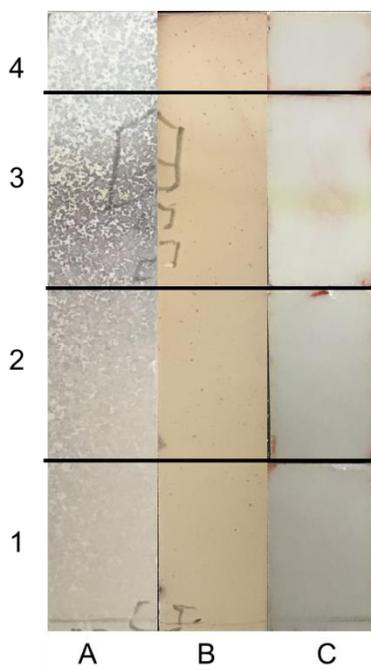


Figura 34. Biorevelado de la fracción A7.

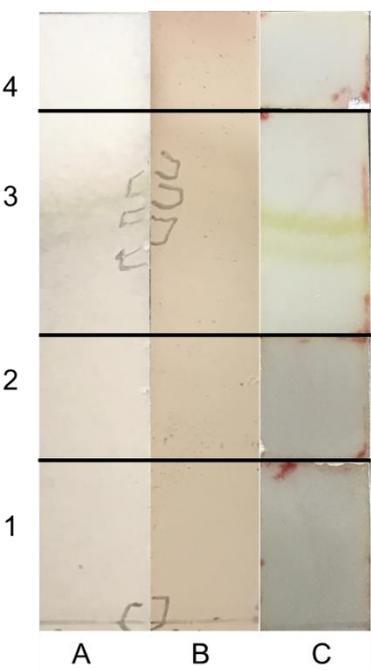


Figura 35. Biorevelado de la fracción A8.

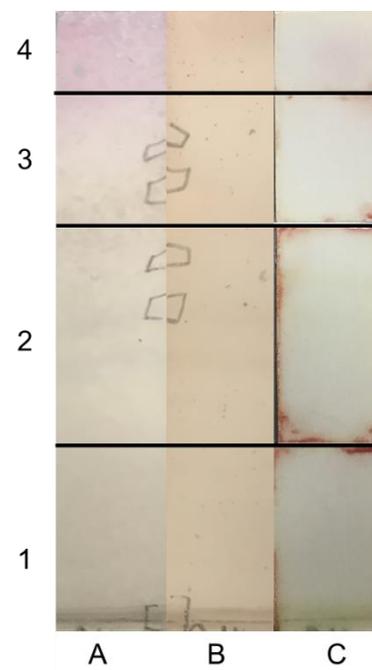


Figura 36. Biorevelado de la fracción A9.

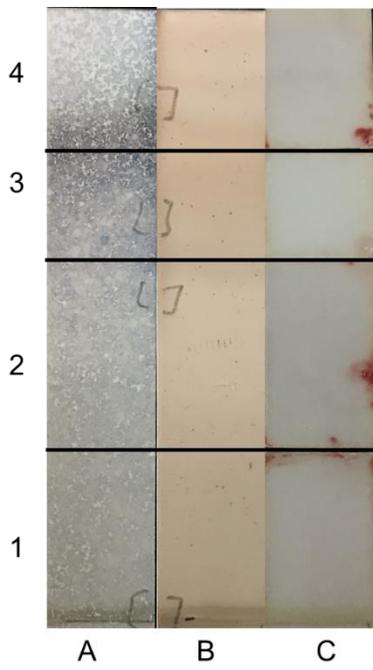


Figura 37. Biorevelado de la fracción A12.

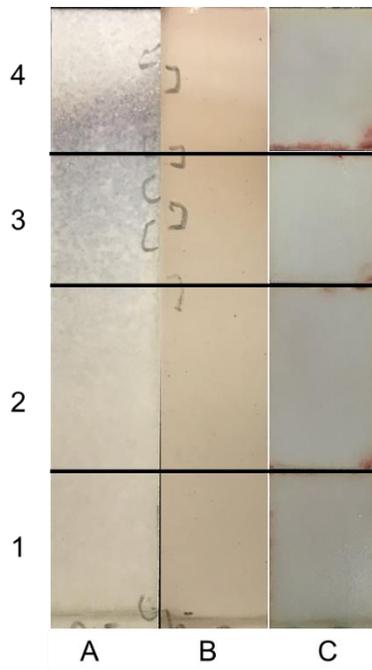


Figura 38. Biorevelado de la fracción A15.

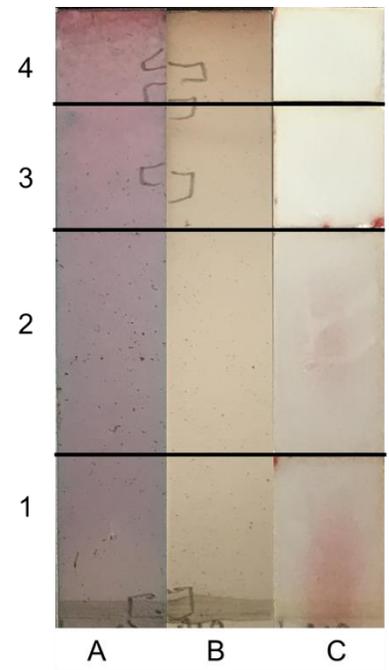


Figura 39. Biorevelado de la fracción A18.

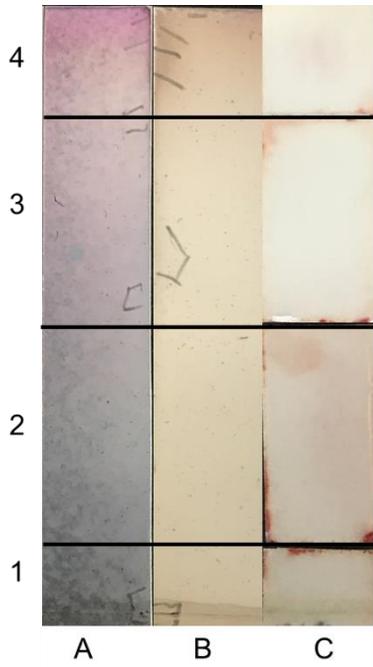


Figura 40. Biorevelado de la fracción A19.

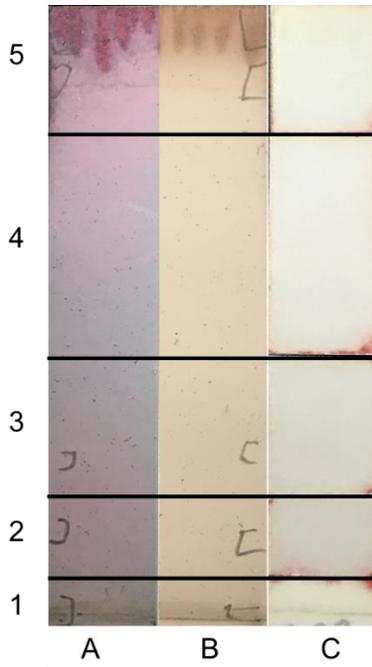


Figura 41. Biorevelado de la fracción A22.

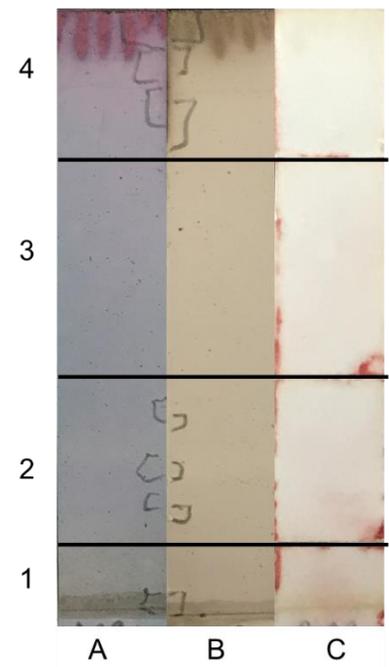


Figura 42. Biorevelado de la fracción A23.

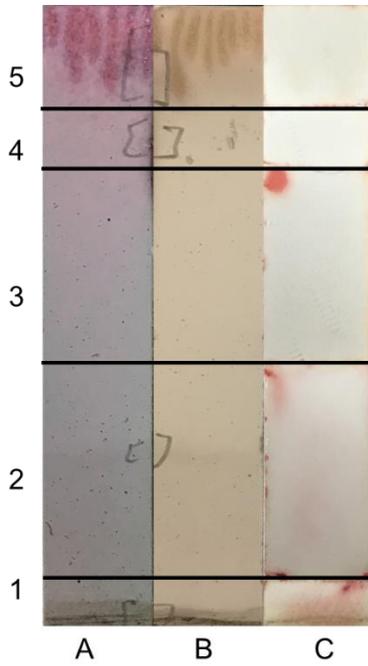


Figura 43. Biorevelado de la fracción A25.

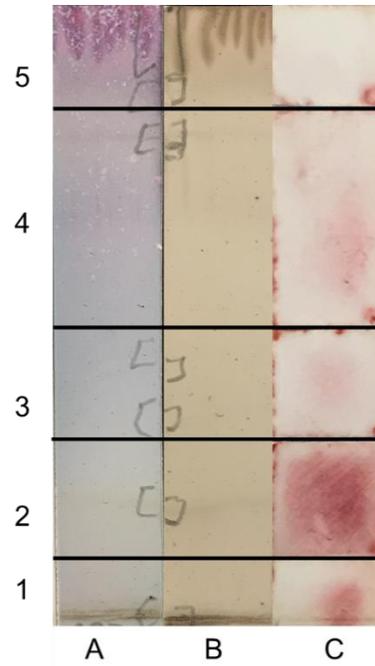


Figura 44. Biorevelado de la fracción A27.

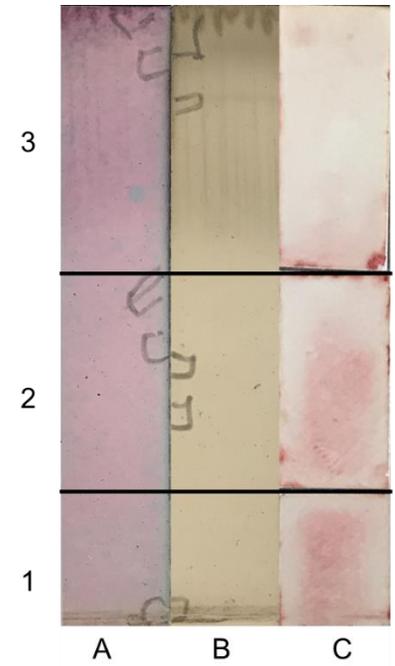


Figura 45. Biorevelado de la fracción A29.

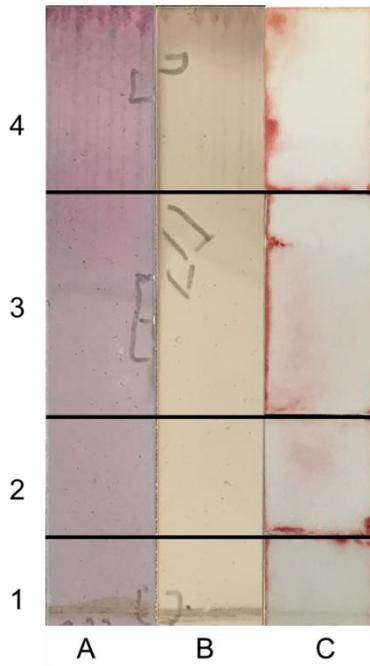


Figura 46. Biorevelado de la fracción A32.



Control positivo



Control negativo

Figura 47. Control positivo (cloranfenicol) y control negativo (acetona).

## Anexo VIII Biorevelados de las fracciones del extracto metanólico

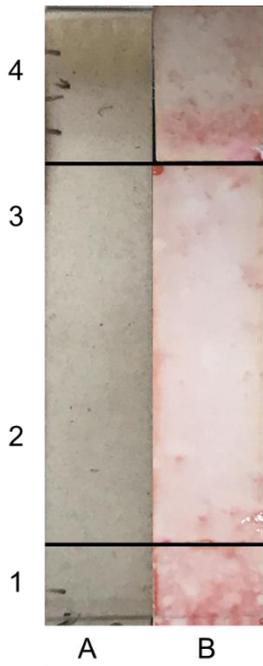


Figura 48. Biorevelado de la fracción M2.

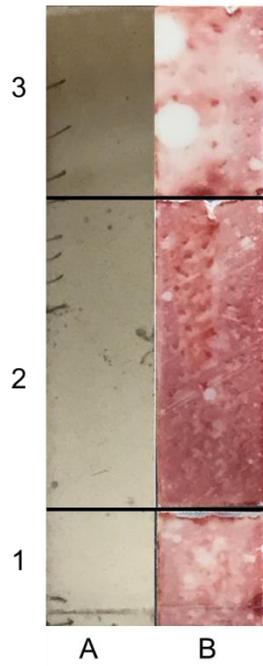


Figura 49. Biorevelado de la fracción M4.

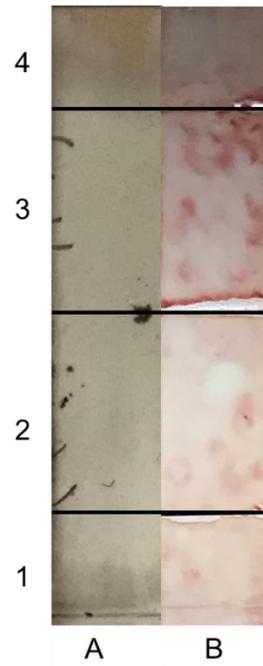


Figura 50. Biorevelado de la fracción M6.

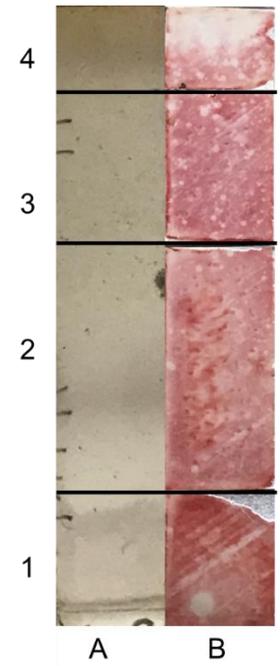


Figura 51. Biorevelado de la fracción M9.

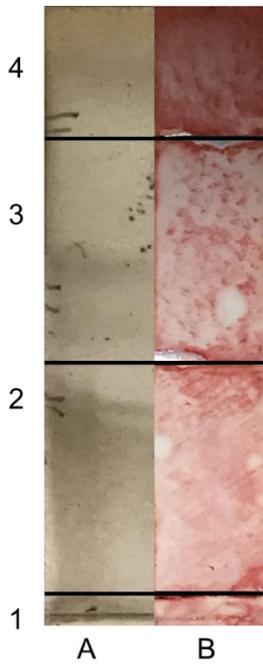


Figura 52. Biorevelado de la fracción M10.

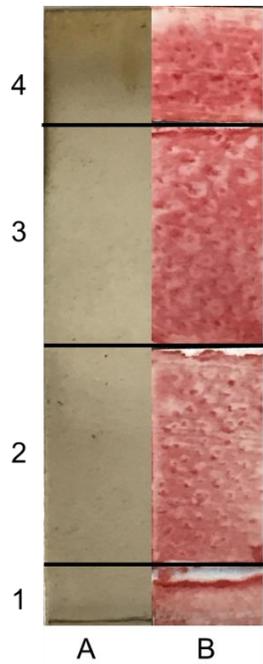


Figura 53. Biorevelado de la fracción M12.

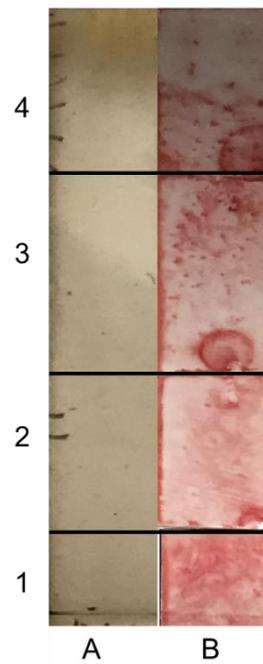


Figura 54. Biorevelado de la fracción M14.

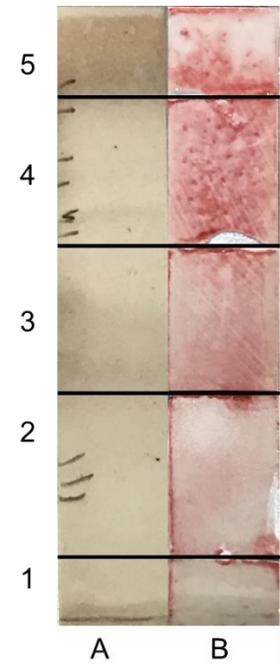


Figura 55. Biorevelado de la fracción M16.

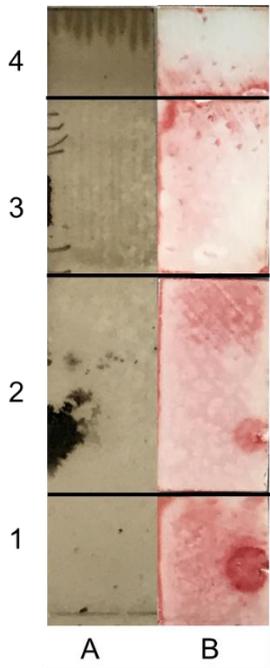


Figura 56. Biorevelado de la fracción M18

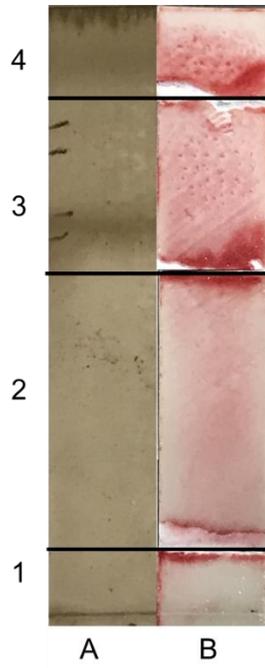


Figura 57. Biorevelado de la fracción M19.

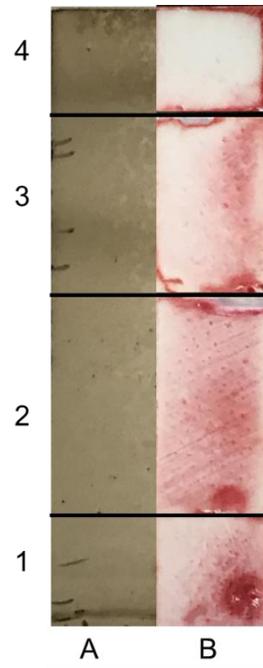


Figura 58. Biorevelado de la fracción M21.

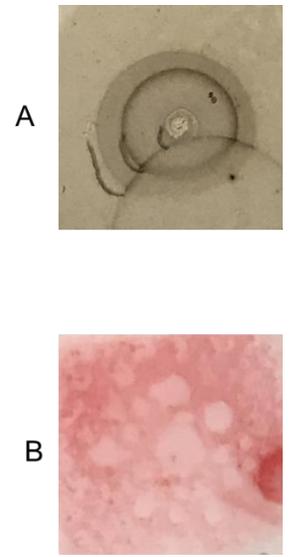


Figura 59. Biorevelado de la fracción M23.



Control positivo Control negativo

Figura 60. Control positivo (cloranfenicol) y control negativo (hexano).