



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
Asterohyptis stellulata (BENTH, 1932).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

P R E S E N T A

GUADALUPE BETSABE ALVAREZ CRUZ

ASESORA: DRA. JULIETA OROZCO MARTÍNEZ



LOS REYES IZTACALA ESTADO DE MÉXICO

2022



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.

Dedicatorias

A mis padres **Consuelo** y **Antonio** por brindarme la libertad y el apoyo para estudiar lo que mi corazón me dictaba, por ayudarme a ser una persona de la que estoy orgullosa. Gracias por los sacrificios que hicieron para brindarme una carrera y una vida en la que nunca me faltara nada. Por la tantas pláticas de motivación y anécdotas que tuvimos para que no perdiera la confianza en mí misma y en lo que soy capaz de lograr, por el amor que me dieron y los abrazos que no me faltaron, por nunca juzgarme y apoyarme en cada paso a pesar de que en ocasiones fueron lentos, por todas sus enseñanzas y valores que me convierten en lo que soy el día de hoy, por defenderme ante cualquier situación cuando mi carácter es débil y sensible, por consentirme y amarme con cada una de sus acciones. Los amo y admiro por ser los mejores padres y sin ustedes no lo habría logrado.

A **Ximena** y **Yael**, mis hermanos por las risa y aventuras que tenemos siempre, por guardar mis secretos y apoyarme en todas mis decisiones, por apapacharme todas las veces que he llorado y hacerme reír, por defenderme y nunca dejarme sola cuando parece que todo va mal, por escucharme, aconsejarme sabiamente y por su cariño incondicional. Gracias por creer en mí y motivarme a avanzar aun cuando la cima parece distante.

A **Luis** por brindarme tu amistad desde hace ocho años, por tu lealtad, tus locuras, por entenderme en todo momento, por tu compañía y apoyo en mi vida, por preocuparte por mí, cuidarme y regalarme experiencias memorables, por la libertad y confianza que tenemos, por ser una pareja inigualable y recordarme que puedo lograr lo que me propongo.

Agradecimientos

Agradecimiento al proyecto DGAPA-PAPIIT, UNAM IN220920 por el financiamiento del proyecto:

“Actividad antimicrobiana de *Asterohyptis stellulata*”

A la doctora **Julieta** por su paciencia, motivación y enseñanzas, por apoyarme y estar al pendiente de mí en el laboratorio y también a distancia, por siempre mantenerse al tanto de mi trabajo, resolver mis dudas, por no desertar conmigo y estimularme constantemente a terminar este proyecto.

A los miembros del comité:

Dra. Ana María García Bores

Dra. Roció Serrano Parrales

Dra, Claudia Tzasna Hernández Delgado

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

Gracias por su enseñanzas y paciencia . Cada uno me apoyó a su manera para lograr concluir este trabajo. Nunca me faltaron palabras de aliento motivación y siempre sentí la confianza de trabajar en al laboratorio con ustedes guiándome. Admiro y estimo mucho a cada uno de ustedes que como mis profesores y miembros de mi comité siempre han tenido una respuesta para cada una de mis dudas.

En resumidas cuentas

José Emilio Pacheco

*¿En dónde está lo que pasó
y qué se hizo de tanta gente?*

*A medida que avanza el tiempo
vamos haciendo más desconocidos.*

*De los amores no quedó
ni una señal en la arboleda.*

*Y los amigos siempre se van.
Son viajeros en los andenes.*

*Aunque uno existe para los demás
(sin ellos es inexistente),*

*tan sólo cuenta con la soledad
para contarle todo y sacar cuentas.*

Índice

Introducción	5
Descripción de <i>Asterohyptis stellulata</i>	9
Área de estudio.....	10
Justificación	14
Hipótesis	14
Objetivos	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares	15
Metodología.....	15
Obtención de extractos.....	15
Evaluación cualitativa de actividad antimicrobiana	16
Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano	18
Determinación de metabolitos secundarios	18
Resultados.....	19
Obtención de extractos.....	19
Evaluación de la actividad antibacteriana	19
Evaluación actividad antifúngica	24
Determinación de metabolitos secundarios	24
Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano	21
Discusión	25
Conclusiones.....	34
Literatura consultada	35
Apéndices	41
Método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)	41
Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1991).....	44
Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano (Kubo et al., 1993)....	46
Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar (Wang y Bun, 2002)	47
Métodos coloridos cualitativos (Domínguez, 1979; Robles-García et al., 2016).	48

Resumen

La medicina tradicional es un sistema de gran utilidad para el conocimiento de los efectos de las plantas sobre diferentes padecimientos. La investigación científica tiene como objetivo evidenciar con fundamentos fitoquímicos y farmacológicos las propiedades de los productos naturales de las plantas, con la finalidad de aportar conocimiento viable en el tratamiento de patologías y ser una alternativa al uso de antibióticos sintéticos; los cuales han perdido su eficacia frente a la resistencia microbiana. Asimismo, los trabajos etnobotánicos forman parte esencial de estas investigaciones, como un panorama general de las plantas usadas para tratar algunas enfermedades y amplían el campo de especies para la investigación. En este contexto se encuentra la especie *Asterohyptis stellulata*, que es usada por los pobladores de la comunidad Los Amates de San José, en Tonicaco, Estado de México; como tratamiento en enfermedades de la piel.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de *A. stellulata*. Se obtuvieron dos extractos metanólicos de esta planta, el primero de inflorescencia y el segundo de la parte aérea; ambos se probaron en cepas de bacterias y hongos miceliados de importancia médica. Las cepas bacterianas se evaluaron mediante el método Kirby Baüer y la microtécnica de dilución en caldo para determinar su actividad antimicrobiana; con base en ello, se determinó el efecto de los extractos sobre la curva de sobrevivencia bacteriana. La actividad antifúngica se evaluó con el método de inhibición del crecimiento radial por difusión y dilución en agar.

De las bacterias evaluadas, *Staphylococcus aureus* fue la cepa más susceptible a los dos extractos; se trabajaron 4 cepas diferentes de *S. aureus* de las cuales la que presentó un CMI menor (0.75mg/mL), fue *S. aureus* FES-C. En cuanto a los organismos fúngicos, se presentó inhibición en *Aspergillus niger* y *Fusarium moniliforme* con los extractos de la parte aérea e inflorescencia respectivamente. Se realizaron pruebas cualitativas a los dos extractos para determinar la presencia de metabolitos secundarios, el grupo de compuestos fenólicos fue el único que se mostró en ambos extractos.

Introducción

Desde tiempos antiguos, los pueblos indígenas buscaron un sistema que les permitiera mantener la salud física y mental de sus habitantes, logrando establecer la medicina tradicional (Jiménez-Silva, 2017). El uso de las plantas medicinales está fuertemente relacionada a esta práctica por ser el recurso más abundante, accesible y conocido. En la actualidad, en países en desarrollo, las plantas medicinales son un tratamiento común para diferentes patologías (de Lorea Carrera y Arjona Ruiz, 2020), asimismo la Organización Mundial del Comercio declara que la medicina tradicional contribuye significativamente al estado de salud de muchas comunidades y además se ha incrementado su uso en comunidades de los países desarrollados (World Trade Organization, 2013).

Las plantas han sido la base de la farmacia y la farmacología constituyendo la medicina tradicional utilizando sus compuestos bioactivos (Samuelsson, 2017). Desde 1980 la influencia de las plantas como medicamentos ha sido significativa. Se estima que entre 1981 y 2006 la mayoría de los medicamentos eran basados en productos naturales (Newman y Cragg, 2007). Cabe destacar que actualmente los productos naturales de las plantas continúan siendo una de las principales inspiraciones para el desarrollo de fármacos y fungen un papel representativo en los fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (de la Torre y Albericio, 2020).

Los productos naturales o metabolitos secundarios son compuestos orgánicos que se generan por las especies vegetales a partir del metabolismo secundario en el que las plantas destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y energía para la síntesis de estas moléculas (Buchanan et al., 2015). A diferencia de los metabolitos primarios, estos no participan directamente en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos (Sierra-Sarmiento, 2018)

La mayoría de los productos naturales se caracterizan por tener una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre un organismo vivo, fungen en la

naturaleza como protección frente al ataque de herbívoros y las infecciones microbianas o virales, inclusive funcionan como atrayentes de insectos polinizadores y como agentes de competencia entre plantas. Su distribución es restringida en el reino vegetal, esto quiere decir que generalmente se halla solo en una especie o en un grupo de especies taxonómicamente relacionadas (Karppinen et al., 2016). Las aplicaciones de los productos naturales se han incrementado en todo el mundo, las empresas farmacéuticas, herbicidas, cosméticas, insecticidas, por mencionar algunas, se han encargado de potenciar la investigación y consumo de nuevos productos (de la Torre y Albericio,2020). La farmacognosia es la rama científica de mayor importancia para la investigación de productos naturales, debido a que se ha encargado de caracterizar las propiedades de los metabolitos secundarios, primeramente, empleados en forma de planta medicinal y posteriormente como moléculas aisladas o extractos caracterizados fitoquímicamente (Badal y Delgoda 2017)

La búsqueda de los productos naturales es entonces una fuente de descubrimiento de nuevos fármacos por su diversidad molecular (Rodrigues et al., 2016), por lo que extiende el campo de investigación para la farmacología en cuanto al tratamiento de diferentes patologías.

Las enfermedades transmisibles se encuentran dentro de las 10 principales causas de defunción a nivel mundial, y engloban enfermedades infecciosas y parasitarias, además de afecciones maternas, perinatales y nutricionales siendo las primeras las de mayor incidencia (World Health Organization, 2020). Las bacterias patogénicas son los principales microorganismos responsables de dichas enfermedades infecciosas que se transmiten de manera directa o indirectamente de una persona a otra (OPS, 2019). La Organización Mundial de la Salud (2018), reveló también una grave falta de fármacos para combatir la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos.

Existen múltiples factores y causas asociados a la resistencia bacteriana a los antibióticos, que permiten que las bacterias desarrollen estrategias más eficientes contra los fármacos, por medio de mecanismos adquiridos o intrínsecos que

elevan la capacidad de las bacterias a sobrevivir (Herrera-Tapia, 2018). *Staphylococcus aureus* es una de las especies precursoras de la resistencia a los antibióticos, asimismo es uno de los microorganismos mayormente aislado en infecciones hospitalarias, estas infecciones inician con la entrada del microorganismo a través de mucosas o una brecha en la piel, pueden afectar localmente o diseminarse causando infecciones potencialmente mortales como bacteriemia, neumonía y osteomielitis (Scher et al., 2014).

Sin embargo, las bacterias (procariotas) no son los únicos microorganismos causantes de alguna patogenicidad, también existen microorganismos eucariotas de gran importancia médica en los que se hallan hongos, protozoos y helmintos (Nau y Metzgart, 2019) Se considera que los microorganismos de origen fúngico han incrementado la resistencia a los compuestos antifúngicos. Esto se debe principalmente al diagnóstico tardío y a los tratamientos empíricos y profilácticos (Rivero-Menéndez, 2019)

En los últimos años se ha observado un aumento en el número de cepas que han desarrollado resistencia, entre las especies más prevalentes del grupo de levaduras se encuentra *Candida albicans* es la especie mayormente aislada de muestras clínicas, seguido de otras especies del mismo género y levaduras de otros géneros como *Trichosporon*, *Saccharomyces* y *Cryptococcus* (Alfonso et al., 2010).

Es importante potenciar la investigación de los productos naturales como punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos, con la finalidad de contribuir al tratamiento de las enfermedades infecciosas con alternativas diferentes a los antibióticos y de este modo disminuir la alta resistencia a estos.

El diccionario de Productos Naturales registró en 2015, aproximadamente 200 000 metabolitos secundarios de plantas, incluyendo 170 000 estructuras únicas, sin embargo existen todavía gran diversidad de plantas que no se han investigado con fines farmacológicos, motivo por el cual es importante potenciar la investigación de los productos naturales como punto de partida para el descubrimiento de

nuevos fármacos con la finalidad de brindar nuevas alternativas al uso de antibióticos y disminuir la resistencia a estos (Harvey, 2015).

La piel es la primera barrera del organismo, está formada por una barrera física llamada epidermis que tiene como función, resistir a la penetración de microorganismos y toxinas; glándulas ecrinas que acidifica la piel para evitar la colonización de los microorganismos. Los microbios residentes son parte integral de la unidad funcional de la piel y otras superficies corporales, interactuando con los tejidos y las redes inmunes para influir en la salud y el funcionamiento (Prescott et al., 2017).

Existen factores de riesgo que predisponen al contagio de infecciones, el deterioro de la integridad de la piel, la falta de higiene, el hacinamiento, la humedad y las inmunodeficiencias; pueden ser causantes de la alteración del microbiota residente o bien ser un blanco para los microorganismos patógenos (Becerra et al., 2017).

Se estima que las infecciones bacterianas cutáneas generan el 20% de las consultas dermatológicas. En la mayoría de los casos se producen infecciones cutáneas leves como forúnculos y abscesos, pero se han descrito casos de fascitis y neumonías necrosantes que en algunos casos han sido letales. El *S. aureus* y *S. pyogenes* producen la mayoría de los trastornos incluyendo las cepas de *S. aureus* resistentes a la metilcilina (SARM) que son un caso de importancia medica mundial (Arango-Duque et al., 2021).

Los hongos también son agentes causantes de micosis superficiales en el ser humano, la mayoría son saprofitos del hombre y son capaces de convivir sin de forma permanente sin causar infección, pero en determinadas condiciones se pueden comportar como agentes infecciosos (Garrote, 2002). Los más frecuentes son los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* y *Candida* (Sanchez-Saldaña et al., 2009).

Descripción de *Asterohyptis stellulata*

La familia Lamiaceae se considera la octava familia con mayor diversidad en México y el número de sus especies representa el 5.5% de la familia a nivel mundial, por lo tanto, el país está considerado como uno de los centros de diversificación más importante. El nombre del género *Asterohyptis* se origina del latín *aster*-estrella e *Hyptis*, por el cáliz con los lóbulos con forma de una estrella, carácter que distingue al género (Martínez-Gordillo, et al, 2017).

El género *Asterohyptis* comprende 4 especies descritas alrededor del mundo, las mismas que se han encontrado en nuestro país (Martínez-Gordillo et al., 2013). Su distribución va desde el norte de México principalmente aunque también se ha reportado en zonas más tropicales; *A. nayarana*, que se distribuye principalmente en Durango y Nayarit, *A seemanni*, que se localiza en el norte del país, con distribución en, Sonora, Chihuahua y Sinaloa, *A. mociniana*, en Sonora, Sinaloa, Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y al sur de Costa Rica y *A. stellulata* la cual se ha encontrado en Nayarit, Jalisco, Michoacán, Morelos, Veracruz, Oaxaca, Chiapas (Turner, 2011) y recientemente colectada en Estado de México para el presente estudio.

Asterohyptis se caracteriza principalmente por ser arbustos o sufrútices con tallos muy ramosos, ramillas delgadas. Hojas simples, lanceoladas a ovadas, membranáceas; pecíolos cortos. Flores con pedicelos cortos; cáliz actinomorfo, 5-lobado, lóbulos más o menos iguales, subulados, rígidos, erectos o levemente recurvados; estambres 4, didínamos, ligeramente exertos. Refiriéndonos solo a una descripción general (Martínez Gordillo et al., 2013).

A nivel género no se ha reportado información fitoquímica, sin embargo, los aspectos fitoquímicos de la familia Lamiaceae pueden dividirse en dos grupos. El primero comprende especies que producen terpenoides volátiles en los aceites esenciales, y el segundo grupo abarca especies que sintetizan componentes en fracciones polares. Algunos de los productos naturales aislados de especies de Lamiaceae son β y α pinenos, mentol y limonenos, también di-tri terpenos, y

flavonoides. Existen géneros con caracteres quimio taxonómicos específicos, sin embargo, no se tiene información fitoquímica de *Asterohyptis* (Frezza, 2019).

Dentro del contexto etnofarmacológico se ha descrito que los productos naturales de la familia Lamiaceae poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, anticancerígeno y antiinflamatorias (Frezza, 2019).

A. stellulata es una especie que cuenta con información muy limitada. Las características botánicas que se pueden destacar son sus hojas delgadas, flores pediceladas, dientes de cáliz espinosos, inflorescencia no capitada, en cuanto a histología se observan células medulares lignificadas y haces de xilema muy separadas entre sí con anchura de 50 μm (Rabei y Gazzar, 2007). Se distribuye en bosque con zonas de disturbio que suelen dar origen a un matorral secundario (Fernández-Nava et al., 1998).

Para complementar la investigación de *A. stellulata* se encontró una revisión de especies utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer, en ella de Jacobo-Herrera et al. (2016), mencionan que esta especie se utilizó en hámsteres para tratar los vómitos, aunque no se determinó ningún compuesto activo. También fue mencionada con uso medicinal, sin más particularidades en un estudio de plantas de interés medicinal hecho por Monroy Ortiz (2013).

Área de estudio

El Municipio de Tonatico se encuentra entre los paralelos 18° 43' y 18° 50' de latitud norte; los meridianos 99° 33' y 99° 43' de longitud oeste; altitud entre 1,200 y 2,200 msnm. Colinda al norte con los municipios de Ixtapan de la Sal y Zumpahuacán; al este con el municipio de Zumpahuacán; al sur con el Estado de Guerrero; al oeste con Guerrero y el municipio de Ixtapan de la Sal. Además, ocupa el 0.41% de la superficie del estado de México (Plan de Desarrollo Municipal, 2019-2021).

A nivel municipio, la orografía de Tonatico se caracteriza ya que un brazo del Nevado de Toluca se abre en dos y así entra al municipio de Tonatico; la cordillera del lado oriente está formada de norte a sur por los Cerros de Tlacopan, Muerto, Tío Neto y Salinas. En igual forma la cordillera del lado poniente, está constituido por los cerros de: Los Tunales, el Portizuelo, La Lagunilla, Del Moral, Tenextepec, La Cruz y el Papalotepec (Vázquez Illana, 1999).

La hidrografía está compuesta por el Río San Jerónimo, el río San Joaquín que sirve como lindero entre Tonatico y Zumpahuacán. El Tlapalla el cual es el lindero entre Pilcaya Gro., e Ixtapan de la Sal. Dos pequeños ríos de agua salada corriendo de norte a sur, rodean la población de Tonatico. Dentro del municipio hay varios arroyitos perennes. Bajo el suelo del territorio del terrero hay agua y eso permite los pozos de reata, aunque el agua no sea potable en un 100% (Vázquez Illana, 1999).

La fauna ha sido exterminada casi por completo, ya son pocos los coyotes, conejos, ardillas, armadillos y otros más pequeños; lo mismo pasa con las aves y los pocos acuáticos con los que se cuenta. Se cultivan las especies caballar, asnar, bovinos, ovino caprino, porcino, avícola, apícola y cunícola (Plan de Desarrollo Municipal, 2019-2021).

El suelo en el municipio está ocupado en su mayor extensión por bosque tropical caducifolio que es el tipo de vegetación que prospera naturalmente en la zona, por su clima y tipo de suelos. Entre las flores silvestres que se han encontrado el cempasúchil, rosa de muerto, maravillas, mantos por mencionar las más comunes. Entre las de cultivo hay rosas, geranios, nardos, tulipanes y claveles. Entre los árboles se identifican: guajes, cedro rojo, copal, clavelinos, cacaloxuchil, cacahuete, espino chato, palo chino, amate, zumancle, tepeguajes, guayabos, ciruelos, entre otros (Vázquez Illana, 1999).

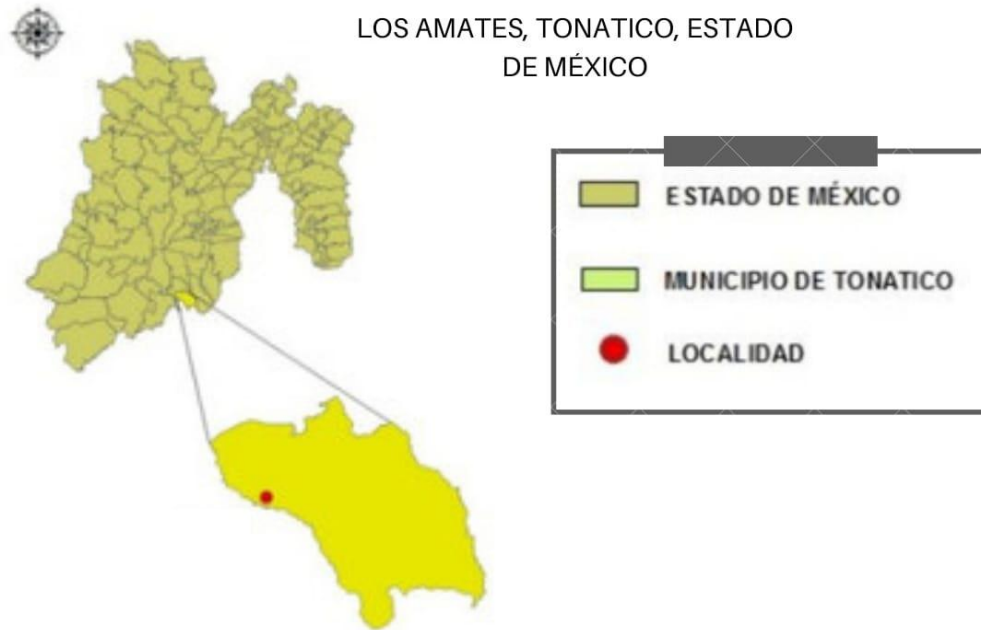


Figura 1. San José de los Amates, Tonicato. Estado de México. Elaboración de Crespo-Moncada (2014).

Los Amates (San José de los Amates) es una comunidad que se encuentra dentro del municipio de Tonicato, cuenta con 508 habitantes, se encuentra en las coordenadas $18^{\circ} 46' 9.46''$ norte y $99^{\circ} 40' 8.23''$ oeste a una altitud 1655 msnm Es el pueblo más poblado en la posición número 4 de todo el municipio. Una de las actividades principales es el trabajo en cultivos como maíz, frijol, cacahuate, tomate y cebolla y la cría de ganado vacuno, otra característica de los pobladores es la práctica de la religión católica, apostólica y romana. Las actividades religiosas se realizan en la iglesia de El Señor San José de Los Amates(Crespo-Moncada, 2014). Asimismo, se ha reportado que la composición florística, destaca por los reportes de 106 especies de árboles y especies arborescentes Dentro de las principales familias agrupadas en 70 géneros y 36 familias, las que más destacan son Fabaceae, Moraceae, Burseraceae (Gómez-Roa, 2013).

Luna-Cespedes (2014) informó que las familias más representativas de las barrancas del municipio de Tonicato son Asteraceae, Fabaceae, Pteridaceae y

Poaceae, mencionó que la flora se ha visto afectada por las actividades humanas, principalmente la agricultura.



Figura 2. Fotografía satelital San José de los Amates, Tonalico. Estado de México (INEGI, 2022).

La comunidad Los Amates dentro del municipio de Tonalico se caracteriza por conservar una flora natural con alta riqueza florística, debido a las barrancas y zonas riparias, se pueden encontrar especies de flora silvestre (Luna-Cespedes, 2014). Esta localidad se distingue del municipio de Tonalico por dos consideraciones importantes que son mencionadas por Chávez-Estrada (2021), es una localidad que no cuenta con mucha investigación etnomédica y farmacognóstica, además de que el servicio de salud en ese municipio es muy limitado, lo que hace de este lugar un sitio ideal para la investigación.

Un estudio etnomédico realizado durante 2017 y 2018 en el municipio de Tonalico, Estado de México, encontró que la especie *A. stellulata* se utiliza por los pobladores de la comunidad Los Amates, para el tratamiento de algunas

infecciones y problemas de la piel (León, en proceso). Es importante que el conocimiento empírico sea acreditado mediante el método científico para su posterior aprovechamiento.

Justificación

El uso de las plantas medicinales para curar algunas enfermedades es una práctica muy común en muchos países, sin embargo, los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos, como resultado de esto, los medicamentos se han vuelto menos eficientes así mismo se buscan nuevas alternativas y productos naturales cuyo potencial curativo sea efectivo. A consecuencia de esto, el estudio de *A. stellulata* tiene como finalidad proponer una nueva opción para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos

Hipótesis

El aporte de los metabolitos secundarios de las plantas se ve reflejado en el efecto que presentan. *A. stellulata* se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de la infección de piel, por lo que es posible que esta especie sintetice metabolitos secundarios a los que se atribuye el efecto antimicrobiano.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Asterohyptis stellulata*.

Objetivos particulares

- Obtener dos extractos metanólicos: inflorescencia y de la parte aérea de *A. stellulata*.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos sobre cepas de bacterias y hongos de importancia clínica.
- Determinar la concentración: mínima inhibitoria (CMI), bactericida mínima (CBM) y fungicida medio (CF₅₀) de los extractos metanólicos.
- Determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios de los extractos.
- Determinar el efecto de los extractos que hayan mostrado actividad antibacteriana sobre la curva de crecimiento bacteriano.

Metodología

Obtención de extractos

El ejemplar de *A. stellulata* se colectó en Tonatico, Estado de México y se depositó un ejemplar en el herbario IZTA para su registro, identificación y número de colecta.

De la planta seca y en trozos, se obtuvieron dos extractos: parte aérea (hoja-tallo) e inflorescencia, a partir de la técnica de maceración. Previamente se registró el

peso de hoja y tallo (282 g.), y de la inflorescencia (271g.) Se obtuvo un macerado en metanol (MeOH), se filtró y posteriormente se destiló a presión reducida. El extracto obtenido se dejó reposar en un recipiente de vidrio para finalizar la evaporación del disolvente. Se determinó el rendimiento para cada uno de los extractos a partir de la diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

Evaluación cualitativa de actividad antimicrobiana

Para la evaluación de la actividad antibacteriana con los dos extractos de *A. stellulata* se utilizaron 7 cepas Gram-negativas y 4 cepas Gram-positivas, además de tres cepas de levaduras y cuatro cepas hongos miceliados que se mencionan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Microorganismos de importancia clínica evaluados con el método Kirby Bauer.

Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram-positivas
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 14506
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	<i>Staphylococcus aureus</i> 23MR
<i>Escherichia coli</i> 82 MR	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
<i>Escherichia coli</i> CUSI	<i>Staphylococcus aureus</i> cc
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Staphylococcus aureus</i> FES-C
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 5281	<i>Staphylococcus epidermidis</i> FES-C
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	
Levaduras	Hongos miceliados
<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton metagrophytes</i> CDBB-H-1112
<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Fusarium monoliforme</i> CDBB-H-265

La evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana se realizó con el método de Kirby Baüer utilizando sensidiscos impregnados con el extracto y metanol, a una concentración 2mg/10 μ L respectivamente, además del uso de sensidiscos impregnados con 25 μ l de Cloranfenicol para bacterias gram-positivas en cuanto a las bacterias gram-negativas los sensidiscos se impregnaron con 25 μ L de Ampicilina los cuales se emplearon como control positivo. Para el control negativo se impregnaron sensidiscos con 10 μ L de metanol (disolvente del extracto) como control negativo. Posterior al ensayo, con ayuda de una regla calibrada en milímetros, se midieron las zonas que presentaron inhibición del microorganismo y se promediaron los resultados (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica se realizó con la técnica de inhibición del crecimiento radial por difusión en agar, se llevó a cabo en cajas Petri con agar papa-dextrosa que se inocularon con el micelio de los hongos en crecimiento que se observan en la tabla 1. Se utilizaron sensidiscos impregnados con 2 mg de cada extracto, disueltos en 10 μ L de disolvente. Los sensidiscos del control positivo se impregnaron con 7 μ g de ketoconazol y el control negativo con 10 μ L del disolvente. Para la interpretación de los resultados el crecimiento del hongo se debe observar afectado, ya sea lento, detenido, o deformado (Wang y Bun, 2002). Las levaduras se evaluaron con el método de Kirby Baüer utilizando sensidiscos impregnados con el extracto y metanol, a una concentración 2mg/10 μ L respectivamente, el control positivo se administró mediante el uso de sensidiscos impregnados con 7 μ g de ketoconazol y el control negativo con 10 μ L del disolvente (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Evaluación cuantitativa de actividad antibacteriana

Para la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Bactericida Media se utilizó la técnica de dilución en caldo con las siguientes concentraciones del extracto: 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 mg/mL, se realizó

previamente la inoculación del cultivo bacteriano en 10 mL de caldo Müller-Hinton y se incubó por 24 horas a 35°C, el control negativo se realizó con 50 µL del Caldo Müller-Hinton con 10 µL del solvente empleado para disolver el problema. Se determinó la concentración en la cual existe una disminución drástica del crecimiento bacteriano, la cual representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se estableció con la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo bacteriano (Koneman, 1991).

Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano

Se evaluó el efecto de los dos extractos metanólicos (MeOH) sobre la curva de crecimiento bacteriano. Para esto se utilizaron dos cepas de Gram positivas (*S. aureus*), que mostraron mayor sensibilidad en las pruebas cuantitativas. Se registró su crecimiento en ocho tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo. Los resultados se analizaron contando las colonias en cada concentración y dilución, mismos que se graficaron con respecto al tiempo para definir los impactos que se requieren para la inactivación bacteriana (Kubo et al., 1993)

Determinación de metabolitos secundarios

Para la determinación cualitativa de metabolitos secundarios en el extracto MeOH de *A. stellulata* se realizaron las siguientes técnicas; para fenoles se realizó una prueba colorida con cloruro férrico (FeCl₃). En cuanto a la identificación de esteroides, se realizó la prueba de Liberman-Bouchard. Para el ensayo de presencia de alcaloides se empleó el reactivo de Dragendorff, para corroborarlo se utilizó el reactivo de Mayer en dicho experimento. La presencia de saponinas se estableció diluyendo el extracto en agua, el cual se agitó durante un minuto, tal mezcla produce espuma, evidenciando las saponinas. Se trabajó con reactivo de Molish para evidenciar los glicósidos en el extracto. Finalmente se recurrió a la

técnica Shinoda la cual proyecta flavonoides presentes (Domínguez, 1979; Robles-García et al., 2016).

Resultados

Obtención de extractos

En la tabla 2 se observa el rendimiento en porcentaje de los extractos MeOH de la inflorescencia y de la parte aérea de *A. stellulata*. El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de inflorescencia, obtenido a partir de 271g de planta seca, y el extracto de la parte aérea a partir de 582 g de planta seca.

Tabla 2. Rendimiento de la extracción con metanol de la inflorescencia y de la parte aérea de *A. stellulata*.

<i>Asterohyptis stellulata</i>	Rendimiento de extracto MeOH	
	g.	%
Inflorescencia	40.9	18.83
Parte aérea	107.99	18.5549

Con respecto a 271 g y 582 g de planta seca para inflorescencia y parte aérea respectivamente.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Los extractos MeOH de inflorescencia y de las partes aéreas presentaron actividad antibacteriana únicamente sobre cepas Gram positivas. Los extractos MeOH de inflorescencia presentaron actividad antibacteriana en *Enterococcus faecalis* ATCC 14506 (10.5 ± 0.7 mm) y *Staphylococcus aureus* cc (8 ± 1.7 mm) mientras que el extracto de la parte aérea tuvo actividad en dos cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (7.33 ± 0.5) y *Staphylococcus aureus* FES-C (13.5 ± 2.1), Gram positivas diferentes a las del extracto de inflorescencia (Figura 3).

En la tabla 3 se presentan los valores de la evaluación cuantitativa (CMI y CBM). La cepa de *S. aureus* FES-C, mostró mayor sensibilidad al extracto MeOH de la parte aérea, por otra parte, en la cepa de *S. aureus* ATCC 29213, el extracto no mostró actividad en las concentraciones establecidas. El extracto MeOH de inflorescencia que tuvo actividad en *E. faecalis* ATCC 14506 tiene valores idénticos

en *S. aureus* cc, debido a que la CMI fue de 1.5 mg/mL en ambos casos. Mientras que las cepas con el extracto MeOH de la parte aérea muestran una concentración inhibitoria mayor a 3 mg/mL en el caso de *S. aureus* ATCC 29213 y en *S. aureus* FES-C la CMI mostró valores de 0.75 mg/mL por lo que se establece que fue la cepa más sensible al extracto MeOH de la parte aérea.

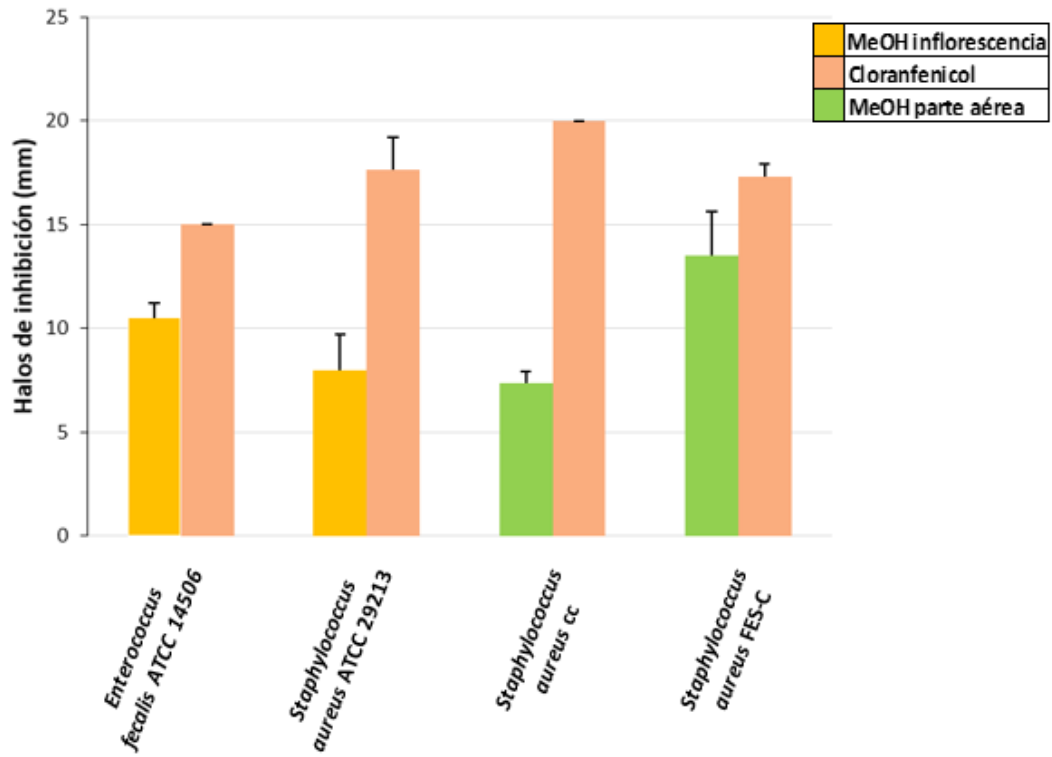


Figura 3. Inhibición de bacterias Gram positivas con los extractos MeOH de inflorescencia y de la parte aérea de *A. stellulata*.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida media (CBM) de los extractos MeOH de Inflorescencia y de la parte aérea de *A. stellulata*

Cepas	MeOH inflorescencia		Cepa	MeOH parte aérea	
	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)		CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>E. fecalis</i> ATCC 14506	1.5	2	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+3	+3
<i>S. aureus</i> cc	1.5	2	<i>S. aureus</i> FES-C	0.75	1.0

Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano

En la figura 4 se muestra el efecto del extracto MeOH de inflorescencia sobre *S. aureus* cc y se observa que la concentración de 1.5 mg/mL, no fue bactericida en ningún intervalo de tiempo sin embargo se puede observar una ligera disminución de la población bacteriana a partir del tiempo 6 (9 horas transcurridas). En cuanto a la 0.75 mg/mL y 2.0 mg/mL se comienzan a detener el crecimiento bacteriano, por lo que podría comenzar el efecto bacteriostático.

La figura 5 muestra el efecto del extracto MeOH de la parte aérea sobre *S. aureus* FES-C y se observa que la concentración de 1.0 mg/mL, no fue bactericida en ningún intervalo de tiempo sin embargo se puede observar una ligera disminución de la población a partir del tiempo 6. En cuanto a la concentración 0.375 mg/mL se puede dilucidar que en el tiempo 6 aumenta la concentración bacteriana, en cuanto a la concentración 0.75 mg/mL existe una variación en la gráfica debido a que el crecimiento disminuye en el tiempo 4 pero posteriormente se vuelve a elevar.

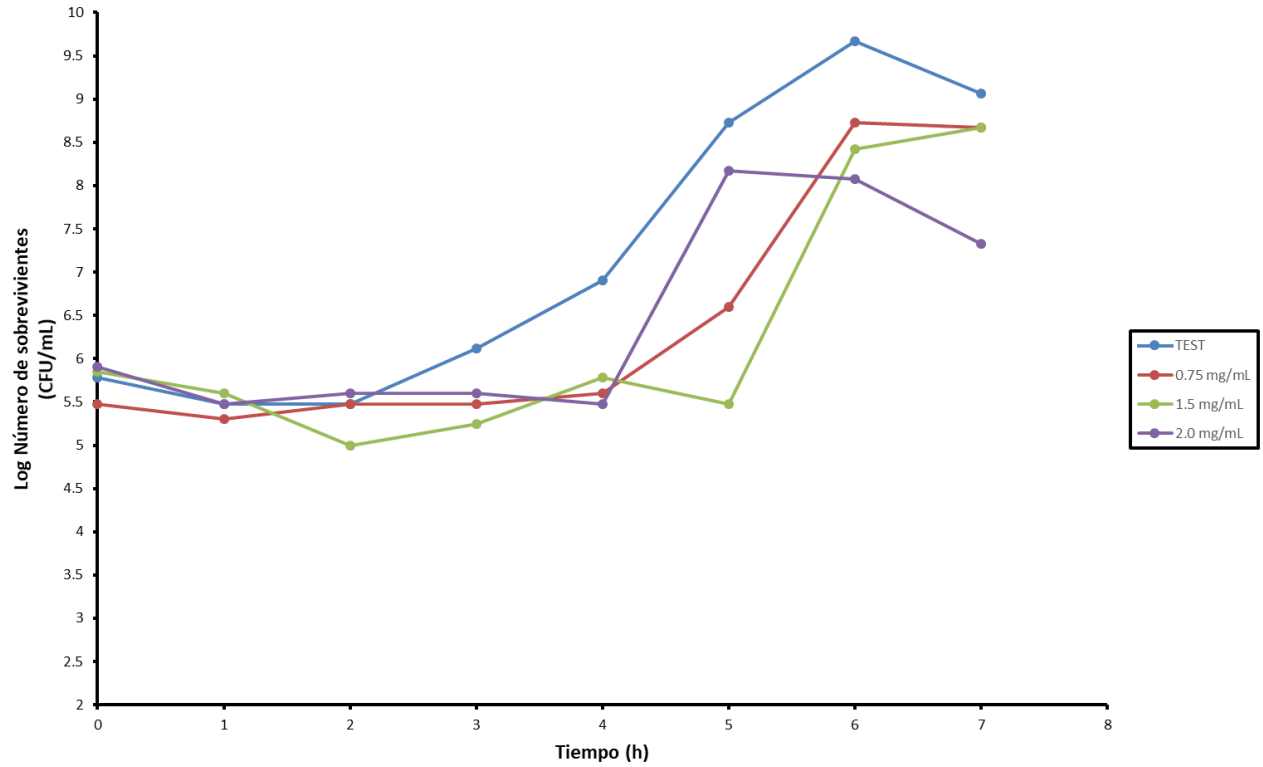


Figura 4. Efecto del extracto MeOH de inflorescencia de *A. stellulata* sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* cc:1/2 CMI*:0.75 mg/mL;CMI*:1.5 mg/mL y CBM*:2.0mg/mL

*Se utilizaron las concentraciones de CMI y CBM obtenidas en la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana, sin embargo la gráfica mostró baja inhibición y nula actividad bactericida.

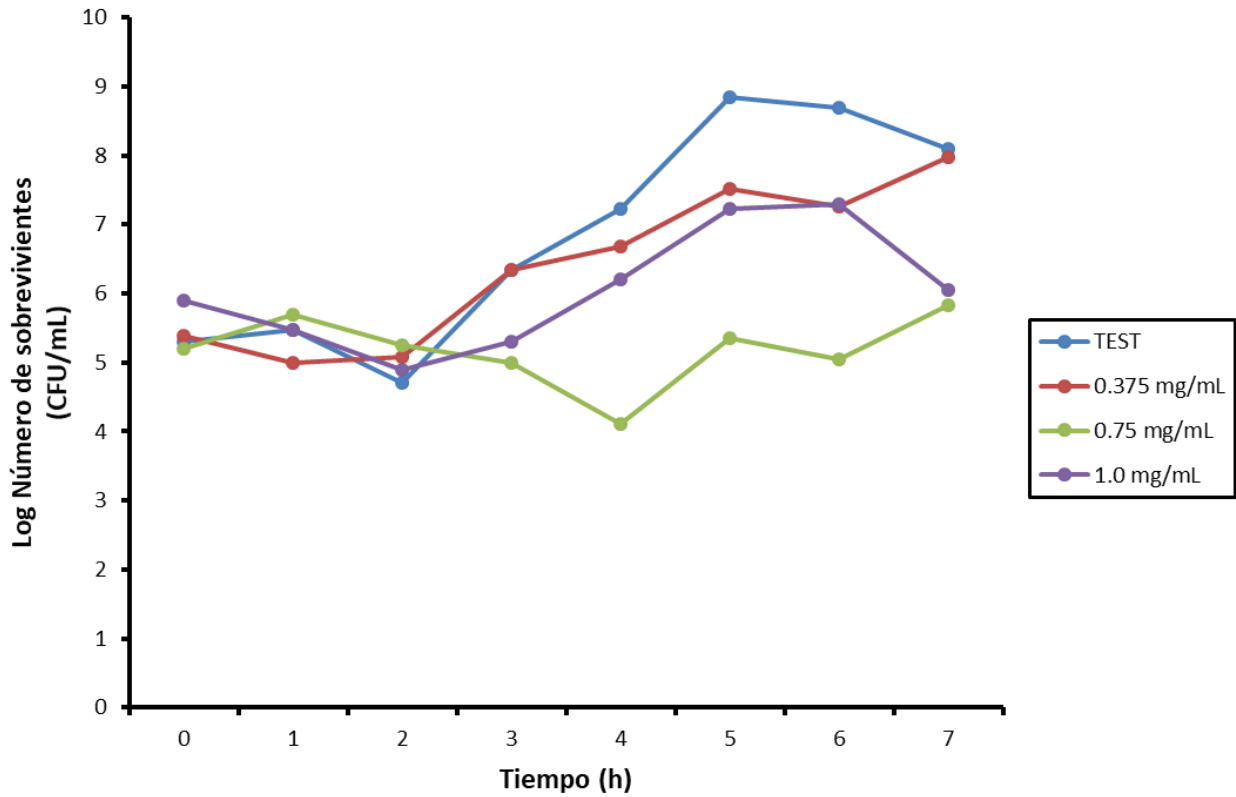


Figura 5. Efecto del extracto MeOH de la parte aérea *A. stellulata* sobre la curva de crecimiento de *S.aureus* FES-C: $1/2$ CMI*:0.375 mg/mL; CMI*:0.75 mg/mL y CBM*: 1.0 mg/mL

*Se utilizaron las concentraciones de CMI y CBM obtenidas en la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana, sin embargo la gráfica mostró baja inhibición y nula actividad bactericida.

Evaluación actividad antifúngica

En la evaluación de la actividad fúngica de los extractos MeOH se observó el efecto sólo en dos cepas, el extracto de inflorescencia tuvo efecto sobre *F. moniliforme* y el extracto de la parte aérea sobre *A. niger* (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antifúngica de los extractos MeOH de Inflorescencia y de la parte aérea, sobre *F. moniliforme* y *A. niger*. Presentó actividad (+) No presentó actividad (-)

Cepa	MeOH inflorescencia	MeOH parte aérea
<i>F. moniliforme</i>	+	-
<i>A. niger</i>	-	+
<i>T. metagrophytes</i>	-	-

Determinación de metabolitos secundarios

La tabla 5 muestra la presencia de fenoles y alcaloides en el extracto MeOH de inflorescencia y en contraste con el extracto MeOH de la parte aérea que mostró fenoles, glicósidos, cumarinas y flavonoides. La presencia de esteroides difiere en el extracto de inflorescencia con respecto al de la parte aérea.

Tabla 5. Metabolitos secundarios en extracto MeOH de inflorescencia y parte aérea de *Asterohyptis stellulata*. Presencia (+) Reacción negativa (-)

Metabolito	MeOH inflorescencia	MeOH parte aérea
Fenoles	+	+
Esteroides	-	-
Alcaloides (Dragendorff)	+	-
Alcaloides (Mayer)	+	-
Saponinas	-	-
Glicósidos	-	+
Cumarinas	-	+
Flavonoides	-	+

Discusión

El consumo de plantas como un recurso para proveer salud, se ha incrementado a nivel mundial en las últimas 2 décadas , la Organización Mundial de la Salud mencionó que aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para su atención primaria de salud, además de considerar a los pueblos indígenas como la mayor fuente de conocimiento de la diversidad de las plantas. Asimismo, solo el 5-15% de las plantas se han investigado con fines farmacológicos (Gil-Rodríguez et al., 2020).

Como es de conocimiento general, la diversidad de pueblos indígenas en México es una representación del amplio panorama cultural por lo que los pobladores de Tonicaco muestran basto conocimiento de las plantas usadas como alternativa para tratar algunos padecimientos, un ejemplo es el uso de *A. stellulata* se utiliza para el tratamiento para la infección de la piel.

Se obtuvieron los extractos de *A. stellulata* (Tabla 2), donde el porcentaje obtenido del rendimiento de los extractos MeOH para inflorescencia y hoja-tallo con respecto al peso seco de la planta, muestran que hay diferencia de 0.2751% entre cada extracto (Tabla 2). El extracto que presentó mayor porcentaje fue el obtenido de la inflorescencia con 18.83% y para el extracto de hoja-tallo tuvo 18.55% por lo tanto, no existe un rango de amplio de diferencia entre los extractos de cada parte de la planta, sin embargo, existen diferentes factores que influyen en el rendimiento de los extractos como son la técnica de extracción, manejo del material vegetal, condiciones físicas, químicas y biológicas a las que se expone la planta (Anaya, 2003).

Los extractos metanólicos tanto de inflorescencia como de la parte aérea mostraron actividad antibacteriana sobre cuatro cepas de bacterias Gram positivas: *E. fecalis* ATCC 14506, *S. aureus* cc, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* FES-C. El extracto MeOH de la inflorescencia mostró actividad sobre *E. fecalis* y *S. aureus* cc. En contraste, los extractos MeOH de hoja y tallo mostraron actividad en dos cepas diferentes de *S. aureus* (Figura 3). Cabe mencionar que en ambos

géneros de bacterias se ha demostrado la alta resistencia a los antibióticos. En el caso de *Enterococcus* se muestra resistencia a las β lactamasas, eritromicina, tetraciclina, vancomicina y ciprofloxacina, mientras que *Staphylococcus* a β lactamasas como penicilinas y meticilina, sin embargo, en ningún género se ha detectado la resistencia al cloranfenicol (Alcalá-García, 2018), resultado que se ve reflejado en los controles positivos con inhibición parcial o intermedia de cloranfenicol (Figura 3).

En relación con el efecto que tienen nuestros extractos, se obtuvo mayor actividad antimicrobiana sobre las bacterias gran-positivas que en las negativas, esto se debe principalmente a la composición de la estructura de la pared celular y sus componentes. Las membranas citoplasmáticas de las bacterias están rodeadas de unas capas rígidas de peptidoglucano (mureína); este elemento proporciona rigidez y se encuentra en mayor proporción en las bacterias gram-positivas en contraste, las bacterias gram-negativas además poseen una membrana externa (Alejandra Musto, 2013), lo que dificulta la penetración de sustancias, en este caso los metabolitos secundarios.

En lo que respecta a los valores de la CMI para *E. fecalis* fue de 1.5 mg/mL, se puede considerar un valor alto con respecto a los antibióticos comúnmente usados como son Ampicilina/amoxicilina y Tetraciclina con valores de 1 μ g/mL y valores menores 4 μ g/mL respectivamente, en cuanto *S. aureus* se obtuvieron CMI de 0.75, 1.5 y > 3.0, para cada una de las cepas utilizadas, siendo la última la que mostró menor sensibilidad. El género *S. aureus* presenta sensibilidad con una gama de antibióticos con valores de CMI que van desde ≤ 0.03 μ g/mL para penicilina y de ≤ 4 μ g/mL en amoxicilina y mupirocina, solo por mencionar algunos ejemplos (Soares et al., 2004). Esta diferencia radical se debe a que los extractos son una mezcla de moléculas presentes de las plantas, de los cuales no siempre se cuenta con información del mecanismo de acción de muchos productos naturales (Villamizar et al., 2021), al contrario de los antibióticos que son compuestos orgánicos sintetizados que actúan en una diana específica y con un mecanismo determinado (Nicolaou, 2011).

La importancia de encontrar algún compuesto activo con efecto antimicrobiano en *S. aureus* radica en que es una de las bacterias que se encuentran dentro del grupo ESKAPE; una sigla conformada con las letras iniciales de las seis bacterias de mayor importancia por su mecanismo de patogenicidad y resistencia antimicrobiana lo que las convierte en organismos evolutivamente muy desarrollados (Santajit y Idrawattana, 2016).

En el presente trabajo se realizó una curva de crecimiento microbiano, probando el extracto de inflorescencia y de la parte aérea de *A. stellulata*, ambos metanólicos, sobre las cepas de *S. aureus* cc y *S. aureus* FES-C respectivamente; se eligieron estas dos cepas debido a su importancia clínica ya mencionada anteriormente por su farmacorresistencia, también se consideraron las cepas con valores intermedios de CMI comparados con las otras cepas utilizadas. La figura 5 muestra el efecto del extracto MeOH de la parte aérea de *A. stellulata*, sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* cc en diferentes concentraciones, durante 24 horas. En la gráfica se observa que la concentración 2.0 mg/mL detiene el crecimiento en el tiempo 2 lo que corresponde a 2 horas después de la aplicación de extracto al inóculo por lo que se puede decir que el extracto tuvo actividad bacteriostática ya que también se observa que la población bacteriana incrementa en el tiempo 6 o sea 12 horas y posteriormente la gráfica muestra una fase estacionaria, por lo que se puede inferir que en un caso de infección (*in vivo*) en humanos, el extracto podría trabajar en conjunto con el sistema inmunológico para la defensa del mismo. Con respecto a la concentración 1.5 mg/mL el crecimiento de la bacteria muestra decreciente en dos ocasiones, en el tiempo 4 y 6 que corresponde a las 5 y 12 horas de exposición respectivamente.

En contraste con la curva del crecimiento de *S. aureus* FES-C tratado con el extracto MeOH de inflorescencia (figura 4), se decae el crecimiento partir del tiempo 2 (2 horas) con la concentración 0.75 mg/mL del extracto, comienza a incrementar el crecimiento bacteriano entre el tiempo 2 y 4 que se ve disminuido en el tiempo 5 (7 Horas después del inóculo); mientras que con la concentración 1.0 mg/mL el crecimiento se detiene en el tiempo 4, y retoma exponencialmente su

crecimiento hasta el tiempo 5. Los fármacos inhibidores de la síntesis de la pared celular como los betalactámicos y la vancomicina tienen un corto efecto post-antibiótico sobre cocos gran-positivos y mínimo para gran-negativos (Carrillo-Esper et al., 2013), tal es el caso de *S. aureus* en el presente documento, ya que hemos mencionado que no se suspende el crecimiento bacteriano completamente después de la exposición a nuestros extractos.

Para tener un resultado exitoso con cualquier tipo de fármaco es importante conocer sobre su farmacocinética y su farmacodinamia; la CMI es un valor que contribuye a una buena interpretación de una curva de crecimiento bacteriano. Existe un grupo de medicamentos bacteriostáticos cuya eficacia está subrogada a la concentración o al tiempo y poseen un efecto post-antibiótico de moderado a prolongado como es el caso de los macrólidos y la clindamicina cuyo efecto post-antibiótico permite que las concentraciones excedan el CMI por menos del 50% del intervalo, y el linezolid cuya eficacia depende de $T > CMI$ (tiempo) durante 24 h (Carrillo-Esper et al., 2013). Los fármacos bacteriostáticos dependientes de tiempo se caracterizan por su actividad bactericida lenta y con un corto efecto post-antibiótico, esta actividad se asemeja a lo observado en las curvas trabajadas con los extractos MeOH de inflorescencia y de la parte aérea de *A. stellulata*, que mostraron efecto corto, además no podemos considerar que los extractos tienen efecto bactericida ya que la población bacteriana no es erradicada.

La combinación de fármacos puede resultar beneficiosa, como se ha demostrado con esquemas compuestos de un betalactámico más aminoglucósido, mejorando la relativamente lenta actividad bactericida (Carrillo-Esper et al., 2013); cabe mencionar que, se descartó una posible sinergia entre el extracto de la parte aérea y de la inflorescencia debido a que se realizó un ensayo con extracto MeOH de la planta completa sobre las cepas en las que se observó efecto con los extractos por separado, sin embargo, no se observó actividad antibacteriana (dicho ensayo no está detallado en el presente trabajo).

Existen diversos y múltiples mecanismos que se llevan a cabo para que los antibióticos puedan ejercer efecto en las bacterias, no obstante, todos operan en

alguno de los siguientes puntos: Inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, modificando la función de la membrana o inhibiendo la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos o ácido fólico (OPS, 2019). Dependiendo del efecto antibacteriano, los antimicrobianos se clasifican tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano); en general son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con el metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica (Calvo y Martínez, 2009). Las oxazolidinonas son inhibidoras de la síntesis proteica, un ejemplo es el Linezolid que como mencionamos anteriormente su eficacia es dependiente de tiempo y se considera bacteriostático para estafilococos y enterococos, actividad similar a la obtenida con los extractos que se utilizaron en este trabajo (Quiroz-Enríquez et al., 2013)

Las oxazolidinonas son compuestos obtenidos por síntesis y su representante en uso es el linezolid. Inhiben la síntesis proteica e impiden la formación del complejo de iniciación 70S, formado por formilmetionil-ARNt, ARNm, diversas proteínas y las subunidades ribosómicas 30S y 50S. El linezolid se fija a la subunidad ribosómica 50S, en el centro peptidiltransferasa dentro del ARN ribosómico 23S (dominio V), distorsiona así el punto de unión del formilmetionil-ARNt y evita, por tanto, la formación del complejo de iniciación; el linezolid es bacteriostático frente a bacterias grampositivas (incluidas cepas multirresistentes de *S. aureus* y *Enterococcus* spp.) y carece de actividad frente a la práctica totalidad de las bacterias gramnegativas (Calvo y Martínez, 2009).

Es de reconocer que *S. aureus* se ha calificado como una importante causa hospitalaria que puede tener consecuencias graves, descrita como la razón más frecuente de infección del torrente sanguíneo, neumonía e infección en la piel tejidos blandos en Estados Unidos, Canadá, América Latina, Europa y la región del Pacífico Occidental, resaltando la resistencia a metilicina (Diekema et al., 2001), siendo una de las razones que dan propósito al presente estudio.

La actividad antifúngica se evaluó sobre *A. niger* y *F. moniliforme*. El extracto MeOH de inflorescencia mostró inhibición positiva en *F. moniliforme* por el contrario el extracto MeOH de tallo y hoja mostró resultado positivo en *A. niger* (Tabla 4). No hay registro de actividad biológica de *Asterohyptis* pero algunos géneros de la familia Lamiaceae la actividad es muy variable, frente a cepas de *Aspergillus* y *Fusarium*. Un ejemplo es el género *Thymus* que muestra actividad radical sobre cepas de *Fusarium* a excepción de *F. moniliforme* (Sanabria-Galindo y Cárdenas-Parroquianos, 2002), y no muestra actividad inhibitoria en el crecimiento de *Aspergillus* (Marques-Camarena, 2015). Los géneros *A. niger* y *F. moniliforme* se consideran organismos oportunistas que puede afectar hospedantes vulnerables, aunque estrictamente no se caractericen por ser dermatofitos pueden causar infecciones en la piel cuando una herida está expuesta y tiene contacto directo con el patógeno es por eso que se consideran de los más importantes (Ocara et al., 2019). La importancia de encontrar extractos con actividad inhibitoria radica en la búsqueda de alternativas dirigidas a la resistencia a los fármacos antifúngicos como los polienos, ya que se han incrementado las infecciones fúngicas causadas por hongos emergentes como *Trichosporon asahii*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* y *Scedosporium* (Pontón y Quindós, 2006). Los antifúngicos utilizados para uso clínico presentan múltiples limitaciones, una de ellas la ineficacia frente a algunas especies fúngicas, por consiguiente, se elevan las tasas de mortalidad y la resistencia a los mismos. Otro aspecto por considerar es la alta toxicidad al combinarse con otros fármacos, administrarse en dosis altas o tratamientos prolongado. Estos puntos confirman la necesidad de la búsqueda de nuevos fármacos que eviten la toxicidad al ser humano (Denning y Bromley, 2015)

En el futuro, se busca una investigación en el terreno de los antifúngicos que, deberá ser actualizada ofreciendo nuevas sustancias más seguras y activas (Carrillo-Muñoz et al., 2015).

Los metabolitos secundarios identificados en el extracto de inflorescencia fueron fenoles y alcaloides, en tanto al extracto de hoja y tallo resultó positivo para fenoles, esteroides y alcaloides de Dragendorff pero en la repetición con la reacción para alcaloides con el reactivo de Mayer el resultado fue negativo (Tabla 5), por lo que se debe corroborar con el reactivo Wager o de Erlich ya que la detección de alcaloides 1-2 insaturados se dificulta especialmente con el reactivo de Dragendorff (Alvares-Martínez, 2004). En la familia Lamiaceae se ha detectado la presencia de fenoles y esteroides, pero no de alcaloides (Frezza, 2019), lo que contribuye a la descripción fitoquímica de *A. stellulata*. Además, a la presencia de alcaloides se le atribuye la actividad como vasoconstrictor, analgésico, antiespasmódico, tóxico, antibacteriano, entre otras (Martínez-Lombardo y Cano-Ortiz, 2009) lo que sustenta la inhibición en las cepas mencionadas anteriormente.

Los alcaloides son muy raros en la familia Lamiaceae de plantas. Aunque existen informes de detección de alcaloides mediante exámenes fitoquímicos e histoquímicos, el único compuesto identificado fue (R) -5- hidroxipirrolidin-2-ona, aislado de *Condea verticillata* (sin. *Hyptis verticillata* Jacq.) (Kuhnt et al., 1995).

Cabe mencionar que el género *Asterohyptis* no ha sido estudiado a profundidad y a continuación se mencionan especies del género *Hyptis* que además de pertenecer a la misma familia, están estrechamente relacionadas taxonómicamente y que la especie *A. stellulata* antes se agrupaba en el género *Hyptis*, hasta que en 1933 se propuso el género *Asterohyptis* (Epling, 1933).

Los ácidos fenólicos se acumulan en varias especies del género *Hyptis*, un ejemplo es en las hojas de *Mesosphaerum pectinatum* (sin. *Hyptis pectinata*) produjeron una serie de ácidos fenólicos identificados como ácido rosmarínico, ácido 3-ometil-rosmarínico, cafeato de etilo, ácido sambacaitarico, ácido 3-O-metil-sambacaitarico, nepetoidina A y B (Falcao et al., 2013).

Otras investigaciones encontraron en *Mesosphaerum suaveolens* (sin. *Hyptis suaveolens*) ácido rosmarínico y rosmarinato de metilo (Tang et al., 2019). Además, en *Hyptis capitata*, *Hyptis atrorubens*, *Condea verticillata*, (sin. *Hyptis*

verticillata), también se corrobora la presencia de ácido rosmarínico (H. Bridi et al., 2021). Por otra parte, en la especie *Condea undulata* (sin. *Hyptis salzmannii*) en donde además de ácido rosmarínico y rosmarinato de metilo también destaca la presencia de ácido p-metoxicinámico (Sousa de Lucena et al., 2013).

Un estudio de Zhu et al (2021) demostró que el ácido rosmarínico presentó inhibición en algunas especies bacterianas grampositivas, en este estudio incluyó una cepa de *S. warneri*, y menciona que el efecto del ácido rosmarínico aumenta la permeabilidad de las membranas de las bacterias, lo que provoca la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal (Calvo y Martínez, 2009).

Algunos de los compuestos fenólicos más estudiados debido a su actividad antibacteriana son el ácido gálico, cafeico y clorogénico, constituyen uno de los grupos más numerosos de los metabolitos secundarios (Gonthier et al., 2006). Uno de los mecanismos de acción de estos compuestos estudiados por Kwon y col. (2007), en el cual utilizaron un modelo de *Staphylococcus* con resistencia a la metilcilina, sometiéndolo lo a los compuestos fenólicos mencionados anteriormente y extraídos de hierbas de la familia Lamiaceae, que corresponde a la misma familia con la que se trabajó el presente estudio. Ellos plantean que estos fenoles podrían tener un comportamiento como análogos de prolina, de tal manera que inhibirían su oxidación, uniéndose a su sitio de acción en la prolina deshidrogenasa, esto se vería reflejado directamente en la membrana de las bacterias.

Para comprender la importancia del papel de la prolina es necesario mencionar que existen péptidos conformados por pocos aminoácidos (12-50) que se ven directamente involucrados en la inhibición de las bacterias, llamados péptidos antimicrobianos (PAM). Entre los aminoácidos más importantes por su dominio en esos péptidos, destaca la prolina, arginina, histidina y triptófano que actúan directamente en la síntesis de proteínas, inhibiendo la replicación (Gedik et al.,

2015), por lo que se puede comprender mejor la función análoga de los ácidos fenólicos.

Conclusiones

El extracto MeOH de inflorescencia de *A. stellulata* tuvo efecto antibacteriano sobre las cepas de *E. fecalis* ATCC 14506 y *S. aureus* cc. Así mismo, presentó actividad antifúngica en *F. moniliforme*.

El extracto MeOH de hoja y tallo de *A. stellulata* mostró actividad antibacteriana en *S. aureus* ATCC 29213, y *S. aureus* FES-C. La actividad antifúngica se mostró en *A. niger*.

La cepa de *S. aureus* FES-C, es la que muestra mayor sensibilidad en el extracto de inflorescencia en concentraciones de 0.75 mg/mL

En la caracterización cualitativa de productos naturales de *A. stellulata* se identificó presencia parcial de fenoles, cumarinas, flavonoides y glicósidos en el extracto MeOH de la parte aérea y fenoles y alcaloides en el extracto MeOH de la inflorescencia.

Literatura consultada

- Alcalá-García, L. 2018. **Escherichia coli, Enterococcus spp. y Staphylococcus spp. en mamíferos y aves salvajes. Diversidad de especies y resistencia a los antibióticos.** [Lectura de conferencia] Universidad de Zaragoza, España.
- Alfonso, C., López, M., Arechavala, A., Perrone, M., Guelfand, L., Biachi, M. 2010. **Identificación presuntiva de *Candida spp.* y de otras levaduras de importancia clínica: Utilidad de Brilliance Candida Agar.** Rev Iberoamericana de micología. 27: 90-93.
- Alvares-Martínez. 2004. **Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloides en plantas del género *Crotalaria* y alimento contaminado para aves.** Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Colombia. pp 18-22
- Anaya, L.A. 2003. **Ecología Química.** Ed. Plaza y Valdés, S.A. de C.V. UNAM. pp.39-63.
- Arango-Duque, L., Miranda-Fontes, M., Pozo-Román, T. 2021. **Enfermedades bacterianas de la piel.** Pediatría Integral. 25(3): 140-145.
- Badal, S., Delgoda, R. 2017. **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy.** Elsevier. pp. 4-12.
- Becerra, A., Predado, M., Riaño, G., Sierra, G. 2017. **Microbiota de la piel identidad de cada individuo.** Biociencias. 2: 53-59.
- Bridi, H., Loreto Bordignon, S.A., de Apel, M.A., von Poser, G.L. 2021. **Terpenes from *Cantinoa (Lamiaceae)* native to Rio Grande do Sul, South Brazil.** Biochem. Systemat. Ecol. 89, (103992).
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. 2015. **Biochemistry & Molecular Biology of Plant.** 2ª ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd. Pp. 1280
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L. 2009. **Mecanismos de acción de los antimicrobianos.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 27(1): 44–52.
- Carrillo Esper R., Zavaleta Bustos M., Álvarez Alcántara H., Carrillo Córdova D., Carrillo Córdova A. 2013. **La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos.** Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 56 (3): 5-11.
- Carrillo Muñoz A.J., Giusiano G., Arechavala A., Negroni R., Tur Tur C., Eraso E., Jauregizar N., Quindós G., Negroni R. 2015. **La utilidad clínica de los derivados triazólicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas.** Rev Española Quimioterapia. 28(4): 169-182.

- Chávez, E. 2021. **Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de tres plantas utilizadas en el municipio de Tonatico, Estado de México, México.** Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. pp 10-18.
- Crespo, M. B. 2014. **Propuesta de turismo rural en san José de los Amates, Tonatico, Estado de México, como alternativa para el desarrollo local.** Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. pp 56-59.
- De la Torre, B.G., Albericio, F. 2020. **The Pharmaceutical Industry in 2019. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules.** *Molecules*. 25(3):745.
- De Lorea-Carrera, Arjona-Ruiz. 2020. **Medicina tradicional: una herencia ancestral y fuente de conocimiento científico.** Facultad de Ciencias Químicas UASLP. 24-29.
- Denning, D.W., Bromley, M.J. 2015. **Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline.** *Science*. 347: 1414-1416.
- Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. N. 2001. **Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999.** *Clinical Infectious Diseases*. 32(2): 114–132.
- Domínguez, X.A. 1979. **Métodos de Investigación Fitoquímica.** México: Ed. Limusa. 45-47.
- Epling, C. 1933. ***Asterohyptis*: A Newly Proposed Genus of Mexico and Central America.** *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 60(1): 17.
- Falcao, R.A., do Nascimento, P.L.A., de Souza, S.A., da Silva, T.M.G., de Queiroz, A.C., da Matta, C.B.B., Moreira, M.S.A., Camara A.A., Silva, T.M.S. 2013. **Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1–7.
- Fernández-Nava, R., Rodríguez Jiménez C., Arreguín Sánchez. M., Rodríguez Jiménez. A. 1998. **Listado florístico de la cuenca del río balsas, México.** *Polibotánica*. 9(1): 151.
- Garrote, A. 2002. **Micosis cutáneas.** *Educación Sanitaria*. 21 (8): 82-90.
- Gedik, A.H., Cakir, E., Gokdemir, Y., Uyan, Z.S., Kocyigit, A., Torun, E., Karakoc, F. 2015. **Cathelicidin (LL-37) and human β 2-defensin levels of children with post-infectious bronchiolitis obliterans.** *The Clinical Respiratory Journal*. 11(2): 243–247.
- Gil Rodríguez, J.R., Herrera Rojas, M.F., Mitre Velasco, Y., Santamaría Rivas, C. 2020. **Compuestos activos utilizados en plantas utilizadas en la medicina tradicional Mexicana.** *Revista RD*. 6 (1): 175-200.

Gonthier, M.P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet J.M., Poutanen, K., Aura M. 2006. **Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro**. Biomed Pharmacother. 60: 536–540.

Gómez-Roa, K. 2013. **Estudio del bosque tropical caducifolio en las barrancas de Tonatico, Estado de México, México**. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 78 pp

Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., Quinn, R.J. 2015. **The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era**. Nature Reviews Drug Discovery 14(2):111-129.

Herrera Tapia, S.A. 2018. **Investigación bibliográfica: factores y causas que aumentan la resistencia bacteriana a antibióticos**. Universidad de Concepción. pp. 13-25.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. [Mapa online] Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/espaciodydatos/default.aspx?ag=151070001>. Consultado el 22 de febrero de 2022

Jacobo-Herrera, N.J., Jacobo-Herrera, F.E., Zentella-Dehesa, A., Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., Pérez-Plasencia, C. 2016. **Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer**. Journal of Ethnopharmacology. 179: 391–402.

Jimenez Silva. 2017. **Medicina Tradicional**. Boletín CONAMED-OPS . 13: 31-34

Karppinen, K., Zoratti, L., Nguyenquynh, N., Häggman, H., Jaakola, L. 2016. **On the developmental and environmental regulation of secondary metabolism in *Vaccinium* spp. Berries**. Frontiers in Plant Science. 7. (655): 1-8.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., Summers, H.M. 1991. **Diagnóstico microbiológico**. Ed. Médica Panamericana. México. 909.

Kubo, I. 1993 **Antimicrobial activity of green tea layer components**. In **Bioactive volatile compounds from plants**. Edited by Teranishi, R. and Buttery, R. G. America Chemical Society. Washington, D. C., USA. 57-70

Kuhnt, M., Probstle, H., Rimpler, R., Bauer, M. Heinrich. 1995. **Biological and pharmaceutical activities and further constituents of *Hyptis verticillata***. Planta Médica. 61: 227-232.

Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., Domingues, F. 2013. **Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids**. Biofouling. 30(1): 69–79.

Luna-Céspedes, R. 2014. **Flora de las barrancas de Tonatico, Estado de México, México**. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 111 pp

Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. R., Montiel, O. 2013. **Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo**. Rev. Mexicana de Biodiversidad. 84: 30-86.

Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R., Gonzales-Gallegos, J.G., Lara-Cabrera, S.I., Zamudio, S. 2017. **Lamiaceae de México**. Botanical Sciences. 95 (4): 780-806.

Martínez-Lombardo., Cano-Ortiz. 2009. **Las plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén**. Boletín. Instituto de Estudios Giennenses. 200: 125-163.

Marques-Camarena. 2015. **Composición química de los aceites esenciales de lavanda y tomillo. Determinación de la actividad antifúngica**. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica Valencia. Valencia. pp. 7-22
Monroy Ortiz, C., García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., Sánchez-Quintanar, C., Mario, L., Uscanga-Mortera, E., González-Romero, V. 2013. **Plants of Local Interest for Medicinal and Conservation Purposes in Morelos, Mexico**. Studies on Ethno-Medicine. 7(1): 13–26.

Musto, A. 2013. **Manual de Microbiología y Parasitología**. Universidad Nacional Arturo Jauretche. Argentina. pp 31-34.

Nau-Cornelissen, C., Metzga-Hobbs. 2019. **LIR. Microbiología**. 4^a ed. Lippincott Williams yWilkins. pp. 452.

Newman, D.J., Cragg, G.M. 2007. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years**. J Nat Prod. 70(3): 461-477.

Nicolaou, K.C., Chen, J.S. 2011. **Classics in Total Synthesis III: Further Targets, Strategies, Methods**. Wiley-VCH.

Ocara, M., Vieille, P., Carvajal, L., Cruz R. 2019. **Hongos en la salud y la enfermedad. Parte 1**. Biol.Micol. 33(2): 01-09

Organización Mundial de la Salud. 2017. **Un Informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos**. Comunicado de prensa. Ginebra. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>. Consultado el 14 de agosto de 2019.

Organización Panamericana de la Salud. **Peligros Biológicos: Inocuidad de Alimentos- Control Sanitario-HACCP**. Recuperado de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es. Consultado el 14 de agosto de 2019.

Organización Panamericana de la Salud. 2019. **Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022**. 8^a ed. Washington D. C.

Pontón, J., Quindós, G. 2006. **Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica**. Med Clin.126 (1): 56-60.

Plan de Desarrollo Municipal de Tonatico 2019-2021 Del H. Ayuntamiento de Tonatico. Recuperado de http://tonatico.gob.mx/publicaciones/2019/5/pdm_19-21.pdf. Consultado el 20 de marzo de 2020.

Prescott, S.L., Larcombe, D.L., Logan, A.C., West, C., Burks, W., Caraballo, L., Campbell, D.E., Levin, M., Van-Etten, E., Horwitz, P., Kozyrskyj A. 2017. **The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming.** World Allergy Organization Journal. 10(1): 1-16.

Quiros-Enríquez, M., Fernández-Ruíz, D.R., Barrios-Romero, B., Milián-Vázquez, P.M. Cisneros-Napóles, Y., Noa Justafé, L. 2013. **Las oxazolidinonas como alternativa en el tratamiento del *Staphylococcus aureus* multirresistente.** Medisur .11 (2).

Rabei, S. y El-Gazzar A. 2007. **Computer-generated Keys to Species of *Hyptis* s.l. (Labiatae).** Taeckholmia. 27: 11-39.

Rivero-Menéndez, O. 2019. **Estudio de los antifúngicos en hongos patógenos humanos.** Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas. pp. 165.

Robles-García, M.A., Aguilar, A.J., Gutierrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-DelRío, J.A., Guerrero-Medina, P.J., Madrigal-Pulido, J.A. y Del Toro-Sánchez, C.L. 2016. **Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxylum capiriPittier*).** Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, 18(3): 3-8.

Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G. 2016. **Counting on natural products for drug design.** Nature Chemistry, 8(6): 531–541.

Sanchez-Saldaña, L., Matos-Sánchez, R., Kumakaw, H. 2009. **Infecciones micóticas superficiales.** Dermatología Peruana. 19 (3): 226-266.

Santajit, S., Indrawattana, N. 2016. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens.** BioMed Research International, 1–8.

Samuelsson, G. 2017. **Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy.** (7 ed.) Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press.

Sanabria-Galindo, A., Cárdenas, L.A., Parroquiano, M.L. 2002. **Actividad antimicrobiana y examen fitoquímico preliminar de siete angiospermas y una muestra de propóleo.** Rev. Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas. 3: 36-42.

Scherr, T.D., Heim, C.E., Morrison, J.M., Kielian, T. 2014. **Hiding in plain sight: interplay between staphylococcal biofilms and host immunity.** Front Immunol. 5, 37.

Sierra-Sarmiento, M.A., Ramón-Barros, A., Gómez-Paternina, D., Mejía-Terán, A., Suarez-Rivero, D. 2018. **Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales.** Fundación Univerisitaria Agraria de Colombia. Bogotá D.C. pp. 7-20.

Soares, M.J., Soares C., Constança Mendes A., Guimaraes M.L., Cabeda J.M., Amorim J.M. 2004. **Assessment of three rapid methods for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus***. J Clin Microbiol. 22(7): 390-1.

Sousa de Lucena, H.F., Madeiro, S.A., Siqueira, C.D., Filho, J.M., Agra, M., da Silva, M.S., Tavares, J.F. 2013. **Hypenol, a new lignan from *Hypenia salzmanni***. Helvetica Chimica Acta. 96(6): 1121–1125.

Tang, G., Liu, X., Gong, X., Lin, X., Lai, X., Wang, D., Ji, S. 2019. **Studies on the chemical compositions of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. J. Serb. Chem. Soc. 84: 245–252.**

Turner, B.L. 2011. **Overview of the genus *Asterohyptis* (Lamiaceae) and description of a new species from northern Mexico**. Phytoneutron. 2:1-6.

Vanden-Berghe, D.A., Vlietinck, A.J. 1991. **Screening methods for antibacterial agents from higher plants.**In: Hostttman, K. Ed. Methods in plant Biochemistry. Assay for bioactivity. Vol. 6. Academic Press. London. 47-69.

Vázquez, I.O. 1999. **Monografía Municipal de Tonatico, Mex.** Crónica Municipal de Toantico.

Villamizar-Macías, V.E., Badrán-Padilla, R., Rodríguez-Ochoa, J., Silva-Román, H. 2021. **Metabolitos secundarios, actividad biológica, y etnobotánica de plantas de Santa Marta.** Editorial Unimagdalena. pp. 398.

Wang, H., Bun, T.N. 2002 **Isolation of an Antifungal Thaumatin-like protein from kiwi fruits** .Phytochemistry. 61: 1-6.

World Trade Organization. 2013. **Chapter 2: The policy context for action on innovation and access.** Recuperado de https://www.wto.org/english/tratop_e/trips_e/trilatweb_e/ch2d_trilat_web_13_e.htm. Consultado el 25 de octubre de 2021.

World Trade Organization. 2020. **Las 10 principales causas de defunción** . Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Consultado el 25 de octubre de 2021.

Apéndices

Método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana o antifúngica de los compuestos de un extracto que son difundidos en el agar. La formación de halos alrededor del disco revela que el crecimiento de la bacteria se ha detenido.

Para los ensayos con las cepas fúngicas se utiliza como medio de cultivo el agar PDA y caldo Sabouraud y para las cepas bacterianas agar y caldo Müller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los compuestos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4mm de espesor produce una mayor disolución del compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo se realiza con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Muller-Hinton, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N°0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml. Una vez que se obtiene la concentración deseada, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de bacteria, antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocular la superficie de una placa con agar de Müller-Hinton, PDA o Sabouraud. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente. Finalmente, se siembra mediante estría en tres direcciones por lo menos, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

La aplicación de sustancias, se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman N° 5. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocarán manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril, deben colocarse por lo menos a 22 mm uno del otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

En todos los casos las muestras deben ser diluidas para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg para bacterias y 4 mg para las levaduras de los extractos disueltos en 10 μ L del solvente correspondiente a cada extracto. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. A los sensidiscos del control negativo se les agrega 10 μ L del solvente empleado para disolver el extracto a evaluar. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 μ g de cloranfenicol. Los sensidiscos se preparan 24horas antes del bioensayo.

Las levaduras y bacterias son cultivadas en una caja de Petri con 20 mL de agar, se colocan en una incubadora a 35°C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbonico en la superficie humeda del agar provocando que el pH disminuya. El desarrollo de los microorganismos es debido al pH acido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Así mismo, la actividad de los compuestos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición.

En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos

los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportarán los valores promedio, asociándoles su desviación estándar.

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1991).

Este método evalúa cuantitativamente la actividad antibacteriana de los extractos, los cuales se incorporan al agar a diferentes concentraciones. Se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). La susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtúbulos en una placa plástica con 96 cavidades (Placa de ELISA). En la placa se colocan 50µL. de caldo Müller-Hinton con las siguientes concentraciones por separado: 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 mg/mL. Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müller-Hinton y se inocula a 35°C durante 24 horas (se produce una solución bacteriana de aproximadamente 10^8 UFC/mL) y posteriormente se realiza una dilución en Caldo Müller-Hinton para que la concentración aproximada sea de 10^5 UFC/mL. En cada cavidad/pozo de la placa se colocan 50 µL de caldo Müller-Hinton con 10 µL de solvente utilizado para disolver la muestra problema, en este caso el extracto.

El grupo testigo se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton y 50 µL de la suspensión bacteriana (10^5 UFC/mL). Una vez que la placa se ha cargado, se mantendrá tapada para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas. Posterior al tiempo de incubación se añade a cada uno de los pozos 50 µL de solución de sal de tetrazolio oxidada al 0.08% (DDT), dejando incubar durante 30 minutos.

El uso de sales de tetrazolio provee de métodos alternos indirectos para medir la actividad respiratoria, que en este caso es de bacterias. La reducción de sal de tetrazolio causa la formación de un precipitado insoluble de coloración rojiza conocido como formazán. En la lectura de la placa, los pozos en los que se desarrolle organismos, el colorante es reducido a rojo visible, produciendo un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara. La concentración en la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) en la que se produce una inhibición

completa del desarrollo bacteriano. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado.

Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano (Kubo et al., 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM obtenidas. De esta manera determinar los impactos necesarios para que se produzca la muerte bacteriana.

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Muller-Hinton. El inóculo que se emplea debe tener una concentración bacteriana de 1.0×10^5 UFC/mL. Una vez determinada la CMI y la CBM se preparan cuatro tubos experimentales, el primer tubo es el testigo al cual no se le agrega extracto, a los tubos restantes se les agrega $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM. Las concentraciones del extracto se preparan en los tubos con 10 mL de caldo Muller-Hinton. A cada tubo se le agregan 100 μ L del inóculo y se incuban durante 24 horas a 37 °C. Durante el tiempo de incubación se muestrea el crecimiento o la muerte microbiana en distintos intervalos de tiempo, que resultan en un total de ocho tiempos. Se muestrea cada hora durante los primeros tres tiempos T0-0, T1-1, T2-2, T3-3, (tiempo-horas transcurridas), posteriormente dos muestreos cada dos horas, un muestreo después de 12 horas transcurridas desde el inóculo y finalmente a las 24 horas.

En cada muestreo se realizan diluciones en tubos con solución salina, de estas se toman alícuotas de 50 μ L, las cuales se siembran en placas con agar Muller-Hinton y se incuban durante 24 horas, transcurrido el tiempo se cuentan las UFC y se calcula el número de UFC/mL en cada tiempo y en cada concentración. Con los datos obtenidos se grafica el Log del número de sobrevivientes vs. el tiempo (en horas) para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación bacteriana, para ello se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar (Wang y Bun, 2002)

Este ensayo se emplea para la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos de un extracto o un compuesto puro. Los compuestos se difunden a través del agar y si estos son activos, el crecimiento del hongo es más lento o se detiene, resultando la deformación de la colonia. El método se lleva a cabo en cajas petri que contienen 20 mL de agar papa-dextrosa (PDA), en el cual se inocula el micelio del hongo activamente en crecimiento. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5. Se impregnan con 2 mg del extracto en este caso, disueltos en 10 μ L del disolvente. Los sensidiscos se preparan 24 h antes del bioensayo, para dejar que el disolvente se evapore por completo. Los discos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial, utilizando una pinza estéril. Los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Como control negativo se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L de disolvente, y como control positivo se usan sensidiscos con 7 μ g de ketoconazol, en ambos casos se dejan evaporar durante 24 h (al igual que los experimentales). Se realizan tres repeticiones. Las cajas se incuban a 28°C durante 72 h o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado. En el caso de existir alguna deformación en el crecimiento del hongo, se reporta el extracto como activo, ya que, en condiciones normales, el crecimiento del hongo es circular y éste debe crecer encima de los sensidiscos con control negativo, también cualquier signo de diferencia de color, esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

Métodos coloridos cualitativos (Domínguez, 1979; Robles-García et al., 2016).

Alcaloides

- Reactivo de Dragendorff:

Se realizan dos soluciones, para la primera se disuelven 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. La segunda solución se prepara 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. Para la preparación del reactivo se debe mezclar 5 mL de la primera solución, 4 mL de la segunda solución y 100 mL de agua. La muestra se analiza disolviendo 2 mg del extracto en etanol y añadiendo unas gotas del reactivo de Dragendorff. La prueba es positiva al dar un precipitado color rojo, naranja o marrón.

- Reactivo de Mayer:

Se disuelven 1.36 g de bicloruro de mercurio en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Se juntan las dos disoluciones y se aforan a 100 mL. El reactivo sólo debe añadirse a disoluciones previamente aciduladas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico diluidos. La disolución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo. La prueba es positiva al dar un precipitado lechoso.

Fenoles

Disolver 2 mg del extracto en un tubo de ensaye con 1 mL de metanol. Agregar unas gotas de cloruro férrico al 1 o 2%. Si el resultado es positivo se observará un anillo morado en la solución de la prueba.

Saponinas

Para dilucidar la presencia de saponinas se realiza una prueba de espuma, consiste en agitar vigorosamente el extracto disuelto en agua tibia , para considerarlo positivo se debe observar la presencia de espuma por más de un minuto.

Glicósidos

- Reactivo de Molisch:

El reactivo de Molisch se prepara mezclando 1g de alfa-naftol en 100 mL de etanol al 95%. El ensayo se realiza disolviendo el extracto en metanol, se le añaden 3 gotas del reactivo de Molisch y se agita. Por la pared del tubo inclinado se depositan 2 mL de ácido sulfúrico. Si el resultado es positivo se observará un anillo morado en la solución de la prueba.

Esteroides

- Reactivo de Lieberman-Bouchard

La preparación del reactivo se lleva a cabo disolviendo 1 mL de ácido acético y 1 mL de cloroformo, se agrega una gota de ácido sulfhídrico y se mezcla ligeramente. Para el análisis se debe disolver 1.5 mg de la muestra en cloroformo y se adicionan unas gotas del reactivo. La presencia de esteroides se observa en presencia de colores rojo o morado.

Cumarinas

- Prueba NaOH

Se realiza disolviendo 100uL de la muestra en una solución de hidróxido de sodio al 10% y después se agregan unas gotas de ácido clorhídrico, si se observa una coloración amarilla que se desaparece al agregar el ácido, se considera una prueba positiva.

Flavonoides

- Prueba Shinoda

Se toma 1 mg de muestra disuelta en etanol se trata con limaduras de magnesio, se le aplica calor (60°C), se agregan unas gotas de ácido clorhídrico concentrado por las paredes. La prueba es positiva si se observan colores naranja, rojo, rosa, rosa-azul a violeta.