



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“CERNIMIENTO BIOLÓGICO DE ALGUNAS
ESPECIES VEGETALES DEL GÉNERO *Ageratina*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

IBT. SARAI ROJAS JIMÉNEZ

CO-DIRECTORES DE TESIS

DRA. VÉRONICA RODRÍGUEZ LÓPEZ

DRA. MARÍA GUADALUPE VALLADARES CISNEROS

CUERNAVACA, MORELOS

2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Esta tesis se desarrolló de la siguiente manera:



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

El trabajo de obtención de extractos se realizó en el Laboratorio 1 de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la asesoría de la Dra. María Guadalupe Valladares Cisneros.



El trabajo de evaluación de las actividades antioxidante y antiinflamatoria se realizó en el Laboratorio 12 de Química de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la asesoría de la Dra. Verónica Rodríguez López.

La evaluación de actividad antimicrobiana se realizó en el Laboratorio 9 de Microbiología en la Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la asesoría del Dr. Oscar Torres Ángeles y la Dra. María Crystal Columba Palomares.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Agradezco al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo otorgado mediante la beca 588463 durante el período de la Maestría en Farmacia.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), por su apoyo en los análisis de cromatografía gases-masa de los extractos evaluados.

Al M. en C. Gabriel Flores Franco del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por la identificación taxonómica de las especies evaluadas en el presente trabajo.

Al Sr. Benito del Municipio de Tlalnepantla y al Sr. Magdaleno Monroy del Municipio de Tlaquiltenango por su papel de guía y compartir conocimientos de la Medicina Tradicional y usos del axihuitl.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por la vida que me has regalado, por no abandonarme nunca y estar en los peores y mejores momentos de mi vida.

A mi comité tutorial:

Dra Véronica Rodríguez López; por todo su apoyo en la realización del proyecto, por compartir su conocimiento, además de su paciencia y comprensión.

Dra María Guadalupe Valladares Cisneros por todo el apoyo en la realización de este proyecto, gracias por dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por brindarme no solo conocimiento, sino también su amistad, gracias por los consejos y por escucharme.

Dr . Oscar Torres Angeles, por las facilidades de trabajar en su laboratorio, así como, la ayuda y correcciones de este trabajo.

Dr. Alexandre Cardoso Taketa, por los comentarios y revisiones para nutrir este trabajo.

A los miembros de mi jurado:

Dra. María Luisa Villareal Ortega

Dra. Leticia González Maya

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Dra. Maria Crystal Columba Palomares

A la Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez, por las observaciones, correcciones y aportaciones en este trabajo.

A todas las personas que me acompañaron durante la realización de este proyecto como la Dra María Crystal Columba Palomares y la M. en F. Lucía Corona Sánchez.

A los chicos de la Escuela de técnicos laboratoristas que me apoyaron: Samaria y Daniela.

A los compañeros de laboratorio 12 de Farmacia: Wendy, Seret, Miriam, Omar y Abraham.

A los compañeros de laboratorio 1 de la Facultad de Ciencias Químicas e ingenierías: Daniel, Ana y Fernanda.

A mi familia: a mi esposo y a mi madre, por todo el aliento y apoyo que me han brindado.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi familia

A mi hija:

María Fernanda Monroy Rojas

Que es la fortaleza y que me ha ayudado a seguir adelante no solo en este trabajo sino en mi vida.

A mi esposo:

Luis Fernando Monroy Torres

Por ser una gran compañero en todo los aspectos, por darme ánimo, por desvelarse conmigo, por acompañarme a coleccionar y hacer todo esto más divertido.

A mi madre:

Francisca Jiménez Fernández

Que me ha enseñado la perseverancia, a esforzarme por lo que quiero y demostrarme que en la vida siempre hay obstáculos y debemos de superarlos, gracias por acompañarme en esta vida, por tener siempre esas palabras para darme fuerzas y seguir adelante.

A mis hermanos:

José Enrique Torres Jiménez

Rosario Torres Jiménez

Que aunque no siempre estemos juntos los quiero mucho.

A ti, que tal vez no eras mi abuela de sangre, pero si de amor y afecto, yo se que ya no estas conmigo, pero fuiste y seguiras siendo una persona importante, que transformó mi vida; con tus consejos, con tu simple compañía. Tú una persona fuerte, valiente y compasiva que siempre dio todo sin pedir nada, gracias por todo Abue Lupis.

A mis amigos que siempre me alentaron y me dieron ánimos; Silvina, Marilem, Ángeles.

A todos mis compañeros de los diferentes laboratorios que tuve la fortuna de conocer, así como a mis compañeros de generación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	<i>XIII</i>
ABSTRACT	<i>XV</i>
1. INTRODUCCIÓN	<i>1</i>
2. ANTECEDENTES	<i>3</i>
2.1. Salud Pública en México	<i>3</i>
2.2. Microorganismos de impacto en Salud Pública.....	<i>5</i>
2.2.1. Terapéutica general de las infecciones.....	<i>10</i>
2.2.1.1. Antibióticos y su clasificación	<i>10</i>
2.2.1.2. Trimetoprim con sulfametoxazol y su mecanismo de acción.....	<i>11</i>
2.2.2.1. Antifúngicos y su clasificación	<i>12</i>
2.2.2.2. Fluconazol y su mecanismo de acción	<i>13</i>
2.2.3. Resistencia a los antimicrobianos.....	<i>15</i>
2.2.4. Determinación de susceptibilidad antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ”	<i>17</i>
2.2.4.1. Método de microdilución en placa	<i>18</i>
2.3. Inflamación.....	<i>19</i>
2.3.1. Proceso inflamatorio	<i>19</i>
2.3.2. Tipos de inflamación	<i>22</i>
2.3.3. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES) y su mecanismo de acción.....	<i>23</i>
2.3.3.1 Indometacina y su mecanismo de acción	<i>25</i>
2.3.3.2. Métodos de evaluación de la actividad antiinflamatoria “ <i>in vivo</i> ”	<i>26</i>
2.3.3.3. Edema auricular en ratón inducido por acetato de tetradecanoil forbol (TPA).....	<i>27</i>
2.4. Actividad oxidante	<i>28</i>
2.4.1. Radicales libres.....	<i>28</i>
2.4.2. Actividad antioxidante	<i>29</i>
2.4.2.1. Antioxidantes enzimáticos	<i>31</i>
2.4.2.2. Antioxidantes no enzimáticos	<i>31</i>
2.4.2.3. Principales métodos para la determinación de actividad antioxidante.	<i>32</i>
2.4.2.4. Método ABTS [del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico)].....	<i>33</i>
2.4.2.5. Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).....	<i>34</i>
2.4.2.6. Método del poder antioxidante reductor férrico (CARF)	<i>35</i>
2.4.3. Cromatografía Gases Masa (GC-MS)	<i>36</i>
2.5. Medicina tradicional y su importancia en México.	<i>37</i>
2.5.1. Plantas medicinales en México y sus principales usos.....	<i>38</i>
2.5.1.1. Uso etnobotánico de las plantas “Axihuitl”	<i>39</i>
2.5.1.2. Familia <i>Asteraceae</i>	<i>41</i>

2.5.1.3. Género <i>Ageratina</i>	41
2.5.1.4. Estudios biológicos del género <i>Ageratina</i>	44
2.6.1.4. Estudios químicos del género <i>Ageratina</i>	48
3. JUSTIFICACIÓN	54
4. HIPÓTESIS	55
5. OBJETIVO GENERAL	55
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
7. METODOLOGÍA	57
7.1. Selección y recolección de la especie vegetales a evaluar.....	58
7.2. Obtención de los extractos vegetales	59
7.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana	60
7.3.1. Método de microdilución en caldo para bacterias.....	60
7.3.2. Método de microdilución en caldo para levaduras.....	64
7.3.2.1. Interpretación de resultados	66
7.4. Actividad antiinflamatoria mediante edema inducido en oreja de ratón con TPA.....	66
7.5. Evaluación de actividad antioxidante	67
7.5.1. Capacidad antioxidante por el método ABTS	67
7.5.2. Evaluación de la actividad antioxidante DPPH	68
7.5.3. Actividad antioxidante reductora de fierro (CARF).....	68
7.5.4. Cromatografía de Gases acoplada a Masas.....	69
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
8.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las especies de <i>Ageratina</i>	77
8.2. <i>Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de las especies de Ageratina</i>	83
8.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de las especies de <i>Ageratina</i>	87
8.4. Cromatografía de gases acoplado a masas.....	92
9. CONCLUSIÓN	107
10. PERSPECTIVAS	108
11. BIBLIOGRAFÍA	110
12. ANEXOS	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales grupos de microorganismos causantes de infecciones	7
Tabla 2 Principales familias de antibióticos según su mecanismo de acción.	11
Tabla 3 Clasificación de los antifúngicos según su mecanismo de acción sobre las estructuras fúngicas	13
Tabla 4 Principales métodos para la determinación de actividad antimicrobiana.....	18
Tabla 5 Clasificación de Antiinflamatorios no esteroideos	25
Tabla 6 Métodos de evaluación in vivo para la determinación de procesos antiinflamatorios.....	26
Tabla 7 Principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes.	29
Tabla 8 Principales métodos de evaluación, para la determinación de la actividad antioxidante.	33
Tabla 9 Plantas medicinales comercializadas mayormente en zonas rurales de México.	39
Tabla 10 Taxonomía tradicional del género <i>Ageratina</i>	40
Tabla 11 Municipios del Estado de Morelos reportados con presencia de especies del género <i>Ageratina</i>	43
Tabla 12 Actividad farmacológica reportada de las diferentes especies del género <i>Ageratina</i>	45
Tabla 13 Compuestos químicos realizados a diferentes especies del género <i>Ageratina</i> ..	48
Tabla 14 Microorganismos seleccionados para la evaluación antimicrobiana.....	61
Tabla 15 CIM de los microorganismos a evaluar reportada por el CLSI.	62
Tabla 16 CMI de las levaduras a evaluar reportada por el CLSI.....	65
Tabla 17 Datos de recolecta y clasificación botánica de las especies de <i>Ageratinas</i> estudiadas.	70
Tabla 18 Rendimiento de extractos de las diferentes especies del género <i>Ageratina</i> en Morelos.....	75
Tabla 19 Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los diferentes antimicrobianos sobre los microorganismos evaluados reportados por el CLSI y los obtenidos como control.....	77
Tabla 20 CMI ($\mu\text{g/mL}$) de los diferentes extractos orgánicos evaluados contra diferentes microorganismos a las 24 h de incubación.	79
Tabla 21 Concentración Inhibitoria Media de los extractos orgánicos de las tres especies de <i>Ageratina</i> , por los métodos ABTS y DPPH. Se reporta \bar{x} promedio \pm DE.....	87
Tabla 22 Contenido químico del extracto acetónico de <i>A. aschemborniana</i> por GC-MS .	93

Tabla 23	Contenido químico del extracto hexánico de <i>A. glabrata</i> por GC-MS.....	95
Tabla 24	Contenido químico del extracto acetónico de <i>A. glabrata</i> por GC-MS.....	97
Tabla 25	Contenido químico del extracto hexánico de <i>A. pazcuarensis</i> por GC-MS.....	99
Tabla 26	Contenido químico del extracto acetónico de <i>A. pazcuarensis</i> por GC-MS.....	101
Tabla 27	Compuestos identificados en los diferentes extractos analizados.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2 Mecanismo de acción del Trimetoprim con Sulfametoxazol en la síntesis del ácido tetrahidrofólico.....	12
Figura 3 Mecanismo de acción de algunos antifúngicos como el fluconazol.	14
Figura 4 Respuesta inflamatoria	22
Figura 5 Estabilización de un radical libre mediante el método.	35
Figura 6 Aspecto de la planta <i>A. aschenborniana</i> , en su hábitat natural.	42
Figura 7 Distribución geográfica de Morelos, municipios donde se localizaron especies de <i>Ageratina</i>	44
Figura 8 Distribución geográfica de los municipios que se seleccionaron para identificación de especies del género <i>Ageratina</i>	58
Figura 9 Esquema de la distribución de las muestras y controles para la evaluación antimicrobiana en placa.	63
Figura 10 Lugar de recolecta de la especie <i>A. aschemborniana</i> (a), así como los arbustos (a) y flor (c) para su identificación taxonómica.	71
Figura 11 Hábitat de la especie <i>A. glabrata</i>	73
Figura 12 Lugar de colecta de <i>A. pazcuarensis</i> (a), así como su interacción con otros géneros (b) y su flor para su identificación taxonómica (c).....	75
Figura 13 Compuestos presentes en el extracto acetónico de <i>A. aschemborniana</i>	94
Figura 14 Compuestos presentes en el extracto hexánico de <i>A. glabrata</i>	96
Figura 15 Compuestos mayoritarios presentes en el extracto acetónico de <i>A. glabrata</i> . .	98
Figura 16 Compuestos presentes en el extracto acetónico de <i>A. pazcuarensis</i>	100
Figura 17 Estructura del 2,7-Diacetil-6-hidroxibenzofurano	101

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Principales causas de muerte en México durante el año 2015.....	3
Gráfica 2. Infecciones con mayor incidencias en México.	4
Gráfica 3. Porcentajes de inhibición de los extractos activos del género <i>Ageratina</i> a una concentración de 0.1mg/oreja de TPA. Se reporta $X \pm DE$, un análisis de varianza y prueba post hoc LSD Y HSD, $p^* < 0.05$, $n=5$	83
Gráfica 4 Concentraciones Inhibitorias Medias de los extractos activos de las diferentes especies de <i>Ageratinas</i> evaluadas con controles <i>C. sinensis</i> y <i>Trolox</i> . Se reporta \bar{p} promedio \pm DE.....	89
Gráfica 5 Equivalentes de $FeSO_4$ con respecto a las concentraciones evaluadas (5000-156.25 $\mu g/mL$), de los diferentes extractos de las diferentes especies de <i>Ageratina</i> estudiadas.	90

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 2 Principio general de la acción de la mayoría de los antiinflamatorios no esteroideos.	24
Diagrama 3 Metodología general del cernimiento biológico de tres especies del género <i>Ageratina</i>	57

ABREVIATURAS

M ⁺	Masa del ion molecular
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
5FU	5- Fluorouracil
ABTS	2, 2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATCC	American Type Culture Collection
CARF	Capacidad antioxidante reductor férrico
CARO	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno
CAT	Catalasa
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CIByC	Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COX	Ciclooxigenasa
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo (por sus siglas en inglés)
EDRF	Factor Relajante Derivado del Endotelio (por sus siglas en inglés)
EO	Estrés oxidativo
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FAP	Factor de Activación Plaquetaria
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
g	Gramo
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Masas
GPX	Glutación peroxidasa
h	Horas
HSD	Honestly Significant Difference
IL	Interleucinas
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
kg	Kilogramo
m	Metros
MEOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
n	Número de repeticiones

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGI	Prostaglandinas
RL	Radicales libres
S/A	Sin actividad
SOD	Superóxido dismutasa
SNIB	Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad
T _{inc}	Temperatura inicial
T _{fin}	Temperatura final
TPA	Acetato de tetradecanoil forbol (por sus siglas en inglés)
tr	Tiempo de retención
TXA	Tromboxanos
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

Los conocimientos etnomédicos en la medicina tradicional mexicana, han permitido identificar plantas con propiedades antimicrobianas, tal es el caso de las plantas conocidas comúnmente como “axihuitl” (Monroy y Castillo, 2010), pertenecientes al género *Ageratina* antes *Eupatorium* (familia *Asterácea*). Las especie vegetales pertenecientes al género *Ageratina*, generalmente se emplean en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones en la piel e infecciones gastrointestinales, así como en lavado de heridas (Cragg y Newman, 2013; Henrich *et al.*, 2013; López y Gutiérrez, 2009). Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el potencial farmacológico (antimicrobiano, antiinflamatorio y antioxidante) de tres especies del género *Ageratina* conocidas en la medicina tradicional de manera indistinta como “axihuitl”. Las especies del género *Ageratina* recolectadas fueron: *A. aschemborniana* (30224) del municipio de Tepoztlán; *A. glabrata* (30225) del municipio de Tlalnepantla y *A. pazcuarensis* (30226) del municipio de Huitzilac.

Las tres diferentes especies de *Ageratina*, se sometieron a un proceso de maceración (partes aéreas) utilizando diferentes disolventes de polaridad creciente (hexano, acetona y metanol). Posteriormente, mediante presión reducida se obtuvieron tres extractos orgánicos para cada especie, a los cuales se les realizó un cernimiento de tres actividades biológicas: antimicrobiana (método de microdilución en placa), antiinflamatoria (modelo murino de edema auricular inducido con TPA) y capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y CARF). El extracto hexánico de *A. glabrata* presentó el mayor potencial antimicrobiano sobre los microorganismos probados que fueron: *P. aeruginosa* (CMI 250 µg/mL), *K. pneumoniae* (CMI 250 µg/mL), *P. mirabilis* (CMI 250 µg/mL), *E. coli* (CMI 250 µg/mL), *S. aureus* (CMI 125 µg/mL), *C. albicans* (CMI 32 µg/mL) y *C. glabrata* (CMI >1000 µg/mL), además demostró tener un amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativa. Sin embargo los extractos de *A. aschemborniana* fueron más específico contra levaduras (CMI de 4 µg/mL contra *C. albicans* y 32

$\mu\text{g/mL}$ contra *C. glabrata*). Por otro lado, las tres especies de *Ageratina* presentaron actividad antiinflamatoria; extracto metanol de *A. aschemborniana* con 80.36%, extracto acetónico de *A. glabrata* con 87.24% y extracto acetónico *A. pazcuarensis* con 89.63 % de inhibición inflamatoria, teniendo como control indometacina con un 91.80%, todas las muestras fueron probadas a una concentración de 0.1 mg/oreja. En el caso de la actividad antioxidante, se observó que el extracto acetónico de *A. aschemborniana* fue el más activo ($\text{CI}_{50} = 6.51\mu\text{g/mL}$) por el método ABTS; sin embargo, comparado contra el control positivo (extracto estandarizado de *C. sinensis*) la actividad fue de 50 %. Los resultados del presente trabajo contribuyen a la generación de evidencia científica que permite validar el uso tradicional de las especies del género *Ageratina* estudiadas, así como una posible fuente de obtención de principios bioactivos, para contribuir al cuidado de la salud.

ABSTRACT

The ethnomedical knowledge in Mexican traditional medicine allowed us to find plants with antimicrobial properties, such as the plants commonly known as "axihuitl" (Monroy and Castillo, 2010), belonging to the genus *Ageratina* before *Eupatorium* (*Asteraceae* family). Plant species belonging to the genus *Ageratina* are generally used in traditional medicine for the treatment of skin and gastrointestinal infections as well as wound washing. (Cragg and Newman, 2013, Henrich *et al.*, 2013, López and Gutiérrez, 2009).

Therefore, the objective of this work was to determine the pharmacological potential (antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant) of three species of the genus *Ageratina* known in traditional medicine indistinctly as "axihuitl". *Ageratina aschemborniana* (30224) was collected in the town of Tepoztlán, *A. glabrata* (30225) was found in Tlalnepantla and *A. pazcuarensis* (30226) was obtained in Huitzilac.

These three species of *Ageratina* were subjected to a maceration (aerial parts) process using different solvents of increasing polarity (hexane, acetone and methanol). Subsequently, three crude organic extracts were obtained for each species, which were monitored for three biological activities: antimicrobial (plate microdilution method), antiinflammatory (murine model of atrial edema induced with TPA) and antioxidant capacity (ABTS, DPPH and CARF). The hexane extract of *A. glabrata* showed the highest antimicrobial potential on the microorganisms tested: *P. aeruginosa* (MIC 250 µg/mL), *K. pneumoniae* (MIC 250 µg/mL), *P. mirabilis* (MIC 250 µg/mL), *E. coli* (MIC 250 µg/mL), *S. aureus* (MIC 125 µg/mL), *C. albicans* (MIC 32 µg/mL) and *C. glabrata* (MIC > 1000 µg/mL), also proved to have a broad spectrum against Gram positive and Gram negative bacteria. However, the extracts of *A. aschemborniana* were more specific against yeasts (MIC of 4 µg/mL against *C. albicans* and 32 µg/mL against *C. glabrata*). On the other hand, the three species of *Ageratina* presented anti-inflammatory activity; methanol extract of *A. aschemborniana* with 80.36%, acetonic extract of *A. glabrata* with 87.24% and acetonic extract *A. pazcuarensis* with 89.63% of

inflammatory inhibition, taking control of indomethacin with 91.80%, all the samples were tested at a concentration of 0.1 mg / ear. In the case of antioxidant activity, it was observed that the acetonic extract of *A. aschemborniana* was the most active (IC₅₀ = 6.51µg / mL) by the ABTS method; however, compared to the positive control (standardized extract of *C. sinensis*) the activity was 50%. The results of this work contribute to the generation of scientific evidence that allows to validate the traditional use of the *Ageratina* species studied, as well as a possible source of bioactive principles, to contribute to health care.

1. INTRODUCCIÓN

México posee diversos climas, que permiten el crecimiento y diversidad amplia de plantas, las cuales se utilizan desde la época prehispánica debido a las propiedades de sus principios activos. Existen numerosos reportes que demuestran que las especies vegetales contienen metabolitos secundarios responsables de su efecto farmacológico y pueden ser utilizadas en el tratamiento de una o varias enfermedades (Lee y Artaza, 2013; Torres, 2004).

Así mismo, las plantas medicinales siguen siendo objeto de estudio para demostrar su acción terapéutica, ya que la naturaleza sigue siendo una importante fuente de diversos principios activos, algunos de ellos muy complejos y diversos (Newman y Cragg, 2010; Cordell y Colvard, 2012).

En México se estima la existencia de cerca de 30,000 especies de plantas, de las cuales alrededor de 4,500 de las mismas, poseen propiedades medicinales, sin embargo, sólo 10% de las especies registradas han sido estudiadas fitoquímicamente y aproximadamente el 5% de éstas han sido evaluadas biológica y/o farmacológicamente (SNIB, 2015; Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Las plantas conocidas comúnmente con el nombre de “axihuitl” (Monroy y Castillo, 2010) pertenecen al género *Ageratina* (familia Asteráceas), y se emplean en la medicina tradicional para tratamiento de artritis, infecciones en la piel y gastrointestinales, así como en el tratamiento de heridas (Cragg y Newman, 2013; Henrich 2013; López y Gutiérrez, 2009). En Morelos se encuentran reportadas diferentes especies del género *Ageratina* y todas ellas se emplean tradicionalmente para los mismos fines sin distinguirse una de otra, por lo que resulta interesante comprobar el efecto farmacológico asociado al uso que tienen en la medicina tradicional algunas especies pertenecientes a dicho género.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que las enfermedades infecciosas provocan el 25% de la morbilidad mundial; trayendo como consecuencia alrededor de 17 millones de decesos al año, además disminuyen la calidad de vida de miles de personas (OMS, 2015).

Una infección es el resultado del establecimiento de un número significativo de microorganismos patógenos dentro de un huésped (Mandell *et al.*, 2006). Una infección asocia frecuentemente una inflamación, por ser esta última una respuesta del sistema inmunológico para contrarrestar cualquier tipo de agresión generada por algún cuerpo extraño o por daño físico al tejido (Puerto *et al.*, 2009).

Diversos estudios demuestran que una inflamación puede ser desencadenada en una infección por la generación de especies oxido reductoras, lo que se conoce como estrés oxidativo. El oxígeno es importante para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, sin embargo, al mismo tiempo representa un peligro potencial debido a las características del mismo, ya que también es responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos de una alta reactividad conocidas como “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO) (Celik *et al.*, 2010).

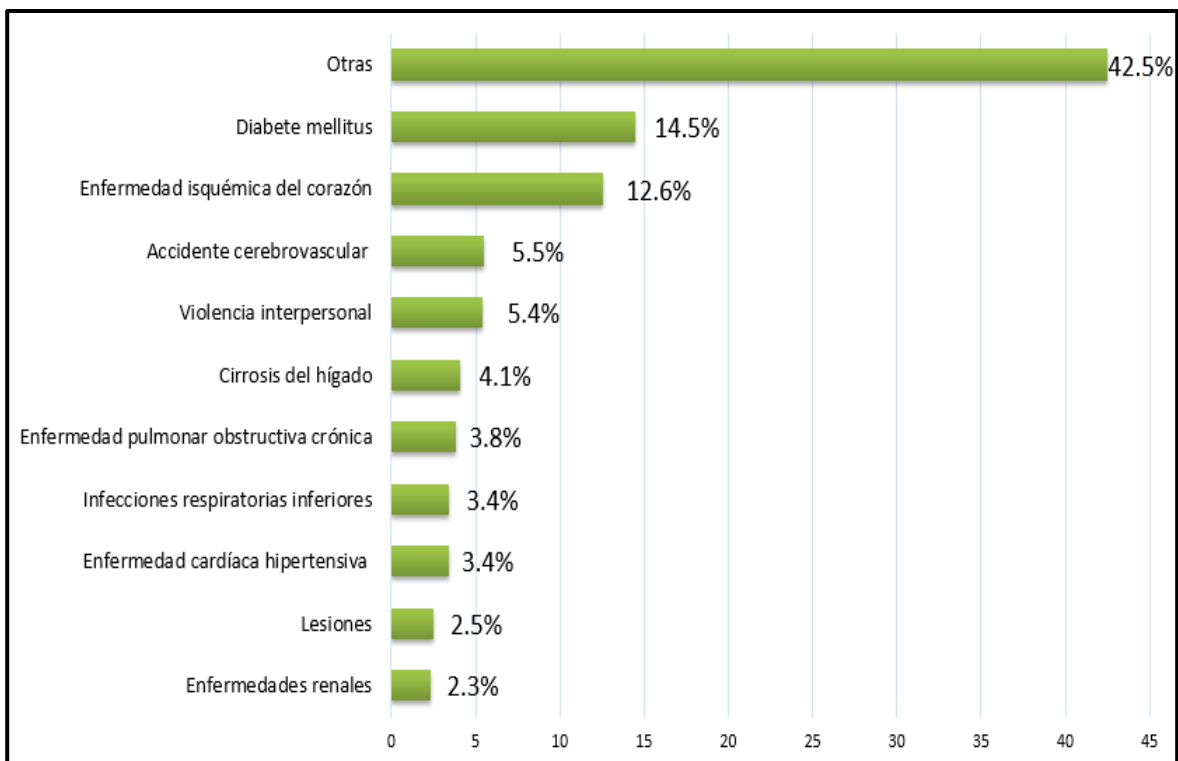
Los compuestos antioxidantes son vitales para el cuerpo humano, pues poseen la capacidad de protegerlo contra el estrés oxidativo de diversas enfermedades. Las ERO se generan en muchas células bajo condiciones fisiológicas y el organismo utiliza mecanismos potentes de defensa para evitar la acumulación de las ERO, no sólo a nivel fisiológico si no también bioquímico (Gil, 2011; Babbar *et al.*, 2011).

En el mercado farmacéutico existen tratamientos para contrarrestar infecciones; sin embargo, a pesar de existir estos tratamientos, el mal manejo y uso de los antibióticos ha generado fármaco-resistencia por parte de los microorganismos, dejando así inutilizables algunos de los medicamentos existentes en el mercado. Por lo anterior, se ha generado un creciente interés en la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de plantas usadas en la medicina tradicional de ahí la importancia de validar los usos de las plantas medicinales como el axihuitl.

2. ANTECEDENTES

2.1. Salud Pública en México

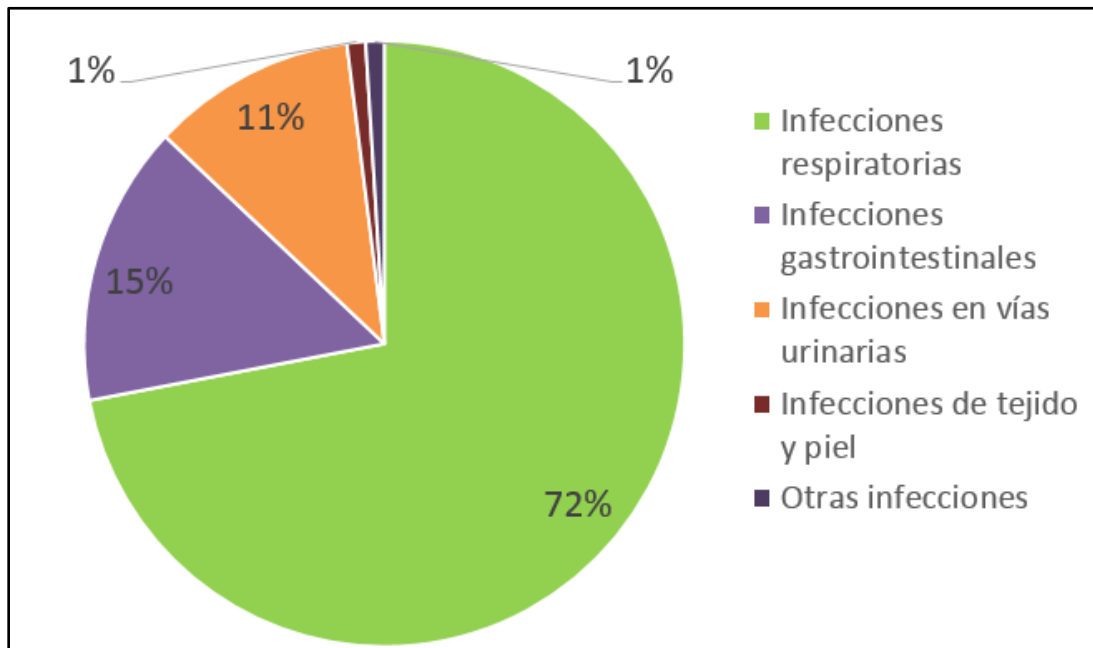
En la actualidad los estilos de vida poco saludables han generado una transición epidemiológica de la salud a nivel mundial. En México, el 98 % de las consultas médicas, atienden problemas relacionados con alguna de las principales enfermedades como: diabetes mellitus, enfermedades del corazón, infecciones respiratorias, así como, gastrointestinales. En la gráfica 1 se observan las principales causas de muerte en México durante el 2015, (Secretaria de Salud Pública, 2015; INEGI, 2015).



Gráfica 1 Principales causas de muerte en México durante el año 2015 (Secretaria de Salud Pública, 2015).

Las infecciones como se observó en la gráfica anterior, siguen representando un problema clínico y epidemiológico, ya que aumentan las tasas de morbilidad y mortalidad, lo cual se suma al incremento de gastos hospitalarios. Los gastos en salud, como porcentaje de la inversión pública en México han aumentando de 2.4% a 3.2% del Producto Interno Bruto (PIB) entre 2014 y 2015. México posee actualmente un rezago de atención epidemiológico por enfermedades infecciosas ligadas a la pobreza, las cuales lamentablemente no son atendidas (Fleicher *et al.*, 2008).

En la gráfica 2, se muestran los porcentajes de los cinco principales grupos de enfermedades infecciosas que tienen mayor incidencia en la población mexicana.



Gráfica 2. Infecciones con mayor incidencia en México (Información Epidemiológica de Morbilidad, 2015).

Las grandes desigualdades en materia de salud, específicamente en lo que respecta a la distribución del equipamiento, personal y recursos para operar, sumado al incremento de la pobreza, limita la capacidad de las personas para enfrentar los problemas de salud. Las infecciones respiratorias, gastrointestinales y urinarias (causadas por bacterias, virus, levaduras o protozoarios) entre otras, son las causantes del mayor número de decesos en México, estas están consideradas dentro las principales afecciones que atentan contra la salud humana en nuestro país y en el mundo, esto principalmente por la resistencia bacteriana y la alta incidencia de infecciones nosocomiales. Por ello, es importante seguir en la búsqueda de tratamientos para contrarrestarlas (Gutiérrez *et al.*, 2008; Lee y Artaza, 2013).

En el Estado de Morelos, la Secretaría de Salud Pública (2015) reporta como la principal causa de morbilidad las infecciones respiratorias causadas por diversos microorganismos (bacterias, virus) con una incidencia de 459,869 casos, mientras que en segundo y tercer lugar están las infecciones gastrointestinales e infecciones de vías urinarias con 110,888 y 88,277 casos respectivamente, dentro de las cuales destacan afecciones como las candidiasis, neumonías y enfermedades diarreicas.

2.2. Microorganismos de impacto en Salud Pública.

La flora microbiana normal es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano. La microbiota normal tiene una relación simbiótica comensal con el hospedador, debido a que

ambos obtienen ventajas, el equilibrio entre las comunidades microbianas es de vital importancia para la salud del ser humano (Patrick *et al.*, 2009).

La naturaleza de la microbiota normal del cuerpo puede ser afectada debido a la resistencia del huésped a las infecciones, así como, a la colonización de otros microorganismos que pueden ser patógenos y generen un desequilibrio, produciendo infecciones (Kumate *et al.*, 2009)

Mandell *et al.*, en 2006 se refiere a las infecciones como un grupo de condiciones que tienen en común la presencia de un número significativo de microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios, virus) mediante diversos mecanismos que afecta a un individuo susceptible, provocando un estado de enfermedad. Estos microorganismos son los agentes causales asociados a diferentes infecciones, los cuales a su vez, pueden proceder de fuentes exógenas o endógenas.

Las fuentes endógenas se encuentran presentes en la flora microbiana normal de las personas (tracto intestinal), mientras que las fuentes exógenas pueden ser causadas por el movimiento de microorganismos desde fuentes externas, como en la piel (manos, pies). Es importante mencionar que un mismo agente puede ocasionar múltiples infecciones, y que una determinada infección puede ser ocasionada por más de un microorganismo patógeno (Vila *et al.*, 2009). Los microorganismos predominantes en algunos tipos de infecciones pueden ser bacterias Gram positivos, bacterias Gram negativos y/o levaduras como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Principales grupos de microorganismos causantes de infecciones
(Modificado de Pérez *et al.*, 2010).

Grupo	Agente etiológico		Tipo de infección
	Género	Especies	
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa.</i>	Urinaria Gastrointestinal
	<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi, S. paratyphi A, B y C.</i>	Gastrointestinal
	<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii, S. sonnei.</i>	Respiratoria y urinaria
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae, K. ozaenae, K. rhinoscleromatis.</i>	Respiratoria
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes, E. cloacae, E. sakazakii.</i>	Gastrointestinal
	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli, E. albertii, E. blattae.</i>	Respiratoria y urinaria
	<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis, P. vulgaris, P. morgani.</i>	Urinaria y dérmica
Bacterias Gram (+)	<i>Streptococcus</i>	<i>S. pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius.</i>	Heridas quirúrgicas Respiratoria
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus, S. epidermidis, S. afermentans, S. haemolyticus.</i>	Dérmica y respiratoria
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis, E. avium, E. durans, E. faecium.</i>	Urinaria
Levaduras	<i>Candida</i>	<i>C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis.</i>	Respiratoria y dérmica

De las infecciones gastrointestinales reportadas por la Secretaría de Salud en el 2015, *Escherichia coli* es el principal microorganismo causante de la diarrea aguda, la cual provoca una enfermedad intestinal infecciosa (Pérez *et al.*, 2010). *E. coli* es responsable de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo (Hernández *et al.*, 2011).

En infecciones respiratorias el principal microorganismo involucrado es *Staphylococcus aureus*, presente en la piel y en las membranas mucosas, sin embargo cuando penetra en los tejidos, produce toxinas ocasionado una amplia gama de infecciones respiratorias como cistitis, bronquitis, neumonía, así como infecciones de piel y tejidos blandos (infección de heridas). Este microorganismo es responsable de más del 70% de las infecciones en niños y representa una quinta parte de las consultas a urgencias pediátricas (Castellanos *et al.*, 2013; Dinges *et al.*, 2006).

Pseudomonas aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Las infecciones por *P. aeruginosa* suelen ser severas, especialmente cuando existe bacteriemia, es decir la presencia de esta bacteria en la sangre (Lebeque *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* frecuentemente ocasiona infecciones adquiridas en el hospital, prolongando el período de hospitalización, incrementando los costos médicos, particularmente en pacientes inmunodeprimidos (Murray *et al.* 2013).

Las bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* se encuentran de forma natural en el suelo, en el agua, así como en humanos y animales, estos últimos, principalmente alojados en los tractos respiratorio, intestinal y urogenital. Las enfermedades causadas por *Klebsiella* incluyen neumonía (una enfermedad inflamatoria de los pulmones), infecciones del tracto urinario (ITU), la espondilitis anquilosante (artritis inflamatoria degenerativa), septicemia (inflamación del cuerpo)(Navarro *et al.*, 2011).

Proteus mirabilis es una bacteria que forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal humano. Está comúnmente asociada con infecciones que afectan el tracto urinario, también se han reportado otras infecciones que incluyen la bacteremia, puede conducir a la formación de cálculos renales o de la vejiga (Villamil *et al.*, 2006).

Por otro lado, muchas de las infecciones no sólo son causadas por bacterias, sino también por levaduras, el género *Candida* es uno de los más representativos, ya que son microorganismos patógenos causante de infecciones que afectan la piel o membranas mucosas. *C. albicans* es una levadura que afecta principalmente la mucosa oral y junto con *C. glabrata* son responsables de infecciones vaginales las cuales generan complicaciones en el embarazo y el parto (Martin *et al.*, 2008).

C. glabrata es una levadura que produce micosis sistémicas graves en los enfermos críticamente inmunodeprimidos y con neoplasias hematológicas. También se puede encontrar presente en mujeres afectadas de vaginitis con flujo aumentado (Kokoto y Adams, 2006). Las candidiasis sistémicas se presentan cuando el microorganismo ingresa al torrente sanguíneo de un huésped con defensas fagocíticas inadecuadas (Pardi y Cardozo, 2002). Por ello, es indispensable establecer y operar sistemas integrales de vigilancia epidemiológica que permitan prevenir y controlar las infecciones de este tipo (Secretaría de Salud, 2015).

2.2.1. Terapéutica general de las infecciones

Los antimicrobianos son moléculas naturales (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintéticas o semisintéticas, capaces de inducir la muerte o detener el crecimiento de bacterias, virus u hongos. Entre los antimicrobianos se encuentran los antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios antivíricos y algunos agentes quimioterapéuticos (Murray y Baron, 2007).

2.2.1.1. Antibióticos y su clasificación

Los antibióticos son un subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana y se han clasificado tradicionalmente como bactericidas (ejercen acción letal para bacteria) o como bacteriostáticos (ejercen inhibición transitoria del crecimiento bacteriano). La acción de los antibióticos generalmente depende de la concentración que alcance en la diana o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo (Calvo y Martínez, 2009). Los bactericidas actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN. Los bacteriostáticos inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Mendoza, 2011).

Los agentes antimicrobianos pueden interferir en diferentes funciones necesarias para la supervivencia y replicación de la bacteria. Los antibióticos de uso clínico, en una clasificación más específica, pueden ejercer su acción en una de las siguientes estructuras o funciones (Murray *et al.*, 2013). En la tabla 2 se muestran las principales familias de antibióticos según su mecanismo de acción.

Tabla 2 Principales familias de antibióticos según su mecanismo de acción (Murray *et al.*, 2013; Calvo y Martínez, 2009).

Mecanismo de acción	Principales familias de antibióticos	Descripción del mecanismo de acción
Inhibición de la síntesis de la pared celular	Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicina, Fosfomicina, Tercoplanina, Bacitracina	Reaccionan con enzimas requeridas para sintetizar peptidoglicano desarrollando puntos osmóticamente frágiles.
Lesión en la permeabilidad de la membrana celular	Poliomixinas, Colistinas, Nistatina, Anfotericina B	Modifican la permeabilidad, permitiendo la salida de iones potasio y ácidos nucleicos, causando un efecto lítico.
Inhibición de la síntesis proteica	Cloranfenicol, Tetraciclinas, Macrólidos, Aminoglucósidos, Eritromicina	Reaccionan inhibiendo el complejo ribosoma-mRNA. en las subunidades ribosomales (80S y 70S)
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas, Sulfonamidas, Rifampicina, Trimetoprim	Bloquean la síntesis de sus componentes, inhibiendo la replicación o deteniendo la transcripción.

2.2.1.2. Trimetoprim con sulfametoxazol y su mecanismo de acción

Estos antibióticos son de un amplio espectro para contrarrestar diversos tipos de infecciones con actividad complementaria, además de ser eficaces en contra de microorganismos sensibles. El trimetoprim es un antibiótico bacteriostático derivado de la trimetoxibenzilpirimidina, mientras que el sulfametoxazol es una sulfonamida de acción intermedia. Ambos actúan sobre la ruta de síntesis del tetrahidrofolato, cuya inhibición provoca finalmente que las bacterias afectadas no puedan sintetizar purinas (Katzung, 2007). El sulfametoxazol bloquea la enzima responsable de la síntesis de tetrahidrofolato,

un paso posterior es la unión de dos moléculas de dihidrofolato en una sola de tetrahidrofolato, en este paso donde actúa trimetoprim, ya que es análogo a este, por lo que bloquea la enzima responsable de la unión, originando un déficit metabólico en la bacteria, lo que facilita su muerte e impide su reproducción (Fig. 1) (Baker, 2009; Murray *et al.*, 2013).

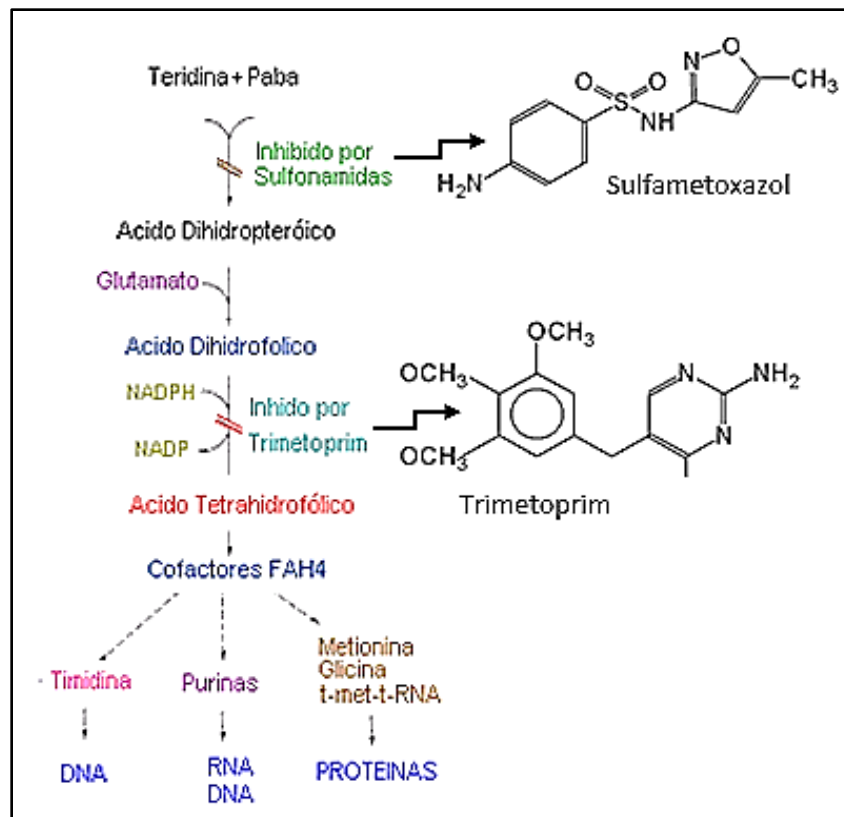


Figura 1 Mecanismo de acción del Trimetoprim con Sulfametoxazol en la síntesis del ácido tetrahidrofólico (Modificado de Mayer, 2016).

2.2.2.1. Antifúngicos y su clasificación

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia,

directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Fernández *et al.*, 2005).

Los antifúngicos actualmente se pueden dividir de la siguiente manera según el tipo de acción (Paredes y Roca, 2004) (Tabla 3).

Tabla 3 Clasificación de los antifúngicos según su mecanismo de acción sobre las estructuras fúngicas (Murray *et al.*, 2013; Calvo y Martínez, 2009; Arenas, 2005).

Tipo de mecanismo	Familia	Ejemplos	Mecanismo de acción
Actúan en pared celular	Lipopéptidos	Papulacandina	Inhibición de síntesis de glucanos mediante la inactivación de la enzima 1,3-betaglucano sintetasa.
Actúan en membrana celular	Polienos, azoles, alilaminas	Nistatina, fluconazol, ketoconazol	Polienos (pérdida de proteínas, glúcidos y cationes), azoles (inhiben la síntesis del ergosterol (citocromo P4503A) y alilaminas (inhiben a la enzima escualeno).
Actúan en núcleo	Pirimidinas fluoradas	Flucitosina	El 5FU (5-fluorouracil) inhibe a la timidilato sintetasa impidiendo la síntesis de proteínas de la célula o reemplaza el uracilo con 5FU en el ARN fúngico.

2.2.2.2. Fluconazol y su mecanismo de acción

El fluconazol es un antifúngico sintético de la familia de los imidazoles, su espectro de actividad es mayor que el de otros antifúngicos imidazólicos

(miconazol, ketoconazol, clotrimazol) y es ampliamente utilizado en el tratamiento de candidiasis. El fluconazol es menos lipofílico y se une menos a las proteínas del plasma, por lo que tiene una mayor biodisponibilidad (Gregori, 2005).

Como otros antifúngicos azoles, el fluconazol ejerce su efecto alterando la membrana celular del hongo. El fluconazol inhibe la síntesis de ergosterol mediante la interacción con desmetilasa 14-alfa, una enzima del citocromo P-450 que se necesita para convertir el lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana (Fig. 2). La inhibición de la síntesis de ergosterol resulta en un aumento de la permeabilidad celular provocando fugas del contenido celular (Bidart, 2004).

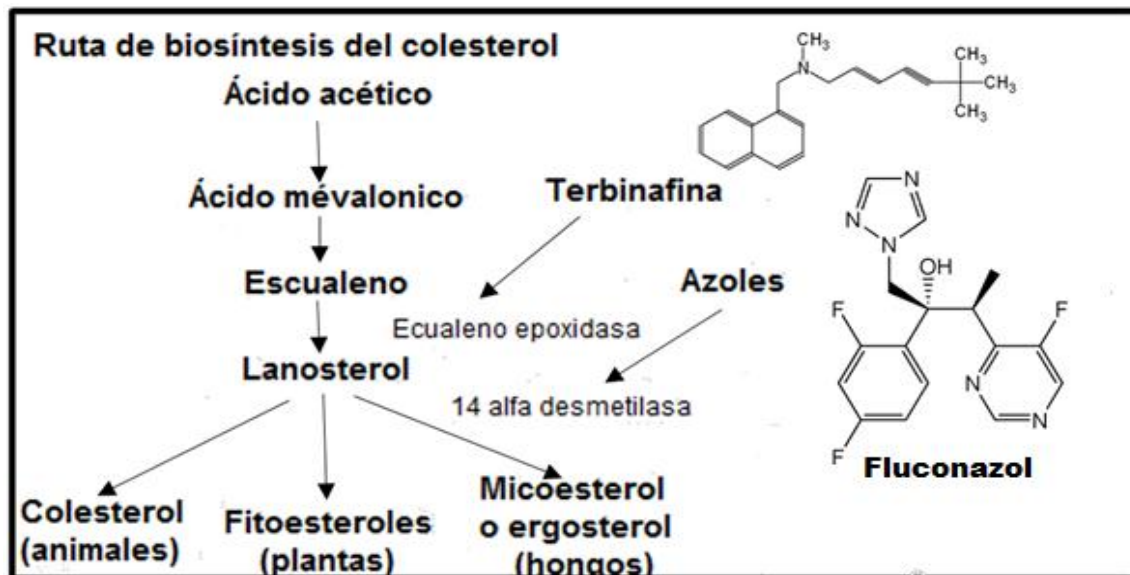


Figura 2 Mecanismo de acción de algunos antifúngicos como el fluconazol (Modificado de Hardman *et al.*, 2008).

2.2.3. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (o farmacorresistencia) se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para tratar las infecciones dejen de ser eficaces. El fenómeno es muy preocupante porque las infecciones por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad (Calvo y Martínez, 2009).

La resistencia a los antimicrobianos se ve facilitada por el uso inadecuado de los medicamentos, el tomar dosis insuficientes o no finalizar los tratamientos prescritos. Los medicamentos de mala calidad, las malas prescripciones y las deficiencias de la prevención y el control de las infecciones son otros factores que también facilitan la aparición y la propagación de la farmacorresistencia (Darren, 2014).

Desde el punto de vista clínico, Darren (2014) señala que se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces inferior a la concentración inhibitoria mínima (CMI). Una concentración por arriba de la CMI califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles. Existen diferentes tipos de resistencia:

Natural o intrínseca. La resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico (Pérez y Robles, 2013).

Adquirida: La resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). Son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos. Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción. (Fernández *et al.*, 2003).

Tipos de resistencia antimicrobiana

Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

1) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En las gram positivas suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas (Pérez y Robles, 2013).

2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden

la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios) o pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente (Pérez y Robles, 2013)..

3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico: Presenta alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos). Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos (Pérez y Robles, 2013)..

2.2.4. Determinación de susceptibilidad antimicrobiana “*in vitro*”.

Para evaluar la actividad antibacteriana se pueden emplear generalmente alguno de los siguientes tres métodos: a) Métodos de difusión, b) métodos de dilución y c) bioautografía (Tabla 4). Los métodos de dilución y difusión evalúan la susceptibilidad antimicrobiana ayudándonos a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (García y Díaz, 2008).

Tabla 4 Principales métodos para la determinación de actividad antimicrobiana.

Método	Principio	Bibliografía
Métodos de difusión	Se basa en una relación entre la concentración para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en una placa de agar.	Ferraro, 2001
Método de dilución	Se basa en la realización de diluciones seriadas del antifúngico en µg/mL de caldo nutritivo, inoculándolos con microorganismos.	López <i>et al.</i> , 2005
Bioautografía	El ensayo se realiza usando cromatogramas	Lizcano y Vergara, 2008

2.2.4.1. Método de microdilución en placa

El método de dilución en agar o en caldo evalúa la susceptibilidad microbiana para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas. Esta herramienta es adecuada para investigar nuevos antimicrobianos (Holland *et al.*, 2009).

En esta técnica son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación (Holland *et al.*, 2009).

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar la CMI, en un gran número de muestras. Es un método de gran sensibilidad por lo que permite la evaluación de cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando

se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Cantón, 2010).

2.3. Inflamación

La inflamación se considera una respuesta defensiva del organismo que se caracteriza por el movimiento de células y fluidos de la sangre hacia los tejidos extravasculares donde se ha generado un estímulo nocivo. Esta reacción vascular tiene como objetivo eliminar los agentes y los tejidos lesionados. Sin embargo, la inflamación puede ser causada por diversos factores como: agentes infecciosos, tejidos necróticos, agentes químicos, agentes físicos e hipersensibilidad (Han *et al.*, 2005).

En un proceso infeccioso si algún patógeno logra atravesar las barreras naturales de la primera línea de defensa se encuentra con la expresión de la inmunidad innata (inespecífica), produciendo factores solubles, proteínas (interferones), células (neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas), esta defensa se expresa provocando un proceso de inflamación; también se hace presente la inmunidad adaptativa (específica) mediante la respuesta humoral (linfocitos B) y la respuesta celular (linfocitos T y macrófagos) (Duarte *et al.*, 2009).

2.3.1. Proceso inflamatorio

En un estímulo inflamatorio inducido por una infección se encuentran implicadas diferentes líneas celulares, las cuales al activarse sintetizan y liberan al medio extracelular sustancias solubles con actividad proinflamatoria, cuya función

es directamente ejercida por la propia sustancia o a través de la activación de otras células con capacidad inflamatoria (Kumar *et al.*, 2010).

Por consiguiente inicia una dilatación de los capilares y arteriolas locales, produciendo un flujo sanguíneo en exceso (vasodilatación). La vasodilatación es provocada por numerosos mediadores químicos de las células del tejido circundante, algunos de ellos como la histamina y algunas prostaglandinas (PGE₂, PGI₂, PGE₁) además del factor activador de plaquetas. También existe un aumento de la permeabilidad de las paredes de las vénulas postcapilares locales, lo que favorece el paso de un volumen de líquido a los espacios intersticiales (Duarte *et al.*, 2009).

Al intersticio (escape de plasma) ingresan grandes cantidades de agua, fibrinógeno, inmunoglobulinas. El paso de proteínas aumenta la presión osmótica y la salida de agua provoca el edema que se localiza en el área de la lesión. El incremento de la permeabilidad vascular se favorece por acción principalmente de la histamina y las prostaglandinas PGE₂ y PGI₁. Como parte de la respuesta inflamatoria se activa la cascada de la coagulación para la formación de fibrina. Esta forma una red que ocluye los vasos linfáticos lo que a su vez limita la diseminación de los microorganismos (Abbas y Lichtman, 2009).

Los macrófagos son fagocitos mononucleares que se forman en la médula ósea, posteriormente emigran hacia tejidos, donde maduran a macrófagos tisulares. Los macrófagos liberan interleucinas (IL-1) leucotrienos, factor de necrosis tumoral (FNT). Mientras que otras células como los mastocitos se activan

por diversos tipos de estímulos, como un traumatismo, estos liberan grandes cantidades de histamina y en menor cantidad heparina (Gómez *et al.*, 2011).

También producen algunas prostaglandinas (PGE₂, PGD₂), leucotrienos y FAP, así como las células endoteliales de los vasos sanguíneos, en la pared de las arteriolas segregan un Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF), capaz de relajar la musculatura lisa de la pared de los vasos, produciendo vasodilatación, las cuales son activadas por diversos mediadores químicos, especialmente por histamina y acetilcolina. Estas células producen, además, grandes cantidades de prostaciclina (PGI₂) (Kumar *et al.*, 2010).

Los polimorfonucleares son células que acceden al área inflamada en primera instancia, se adhieren a las células endoteliales y atraviesan la pared del vaso sanguíneo y emigran hacia el agente irritante. De los tres tipos de polimorfonucleares existentes, neutrófilos, basófilos y eosinófilos, son los primeros los que mayor trascendencia tienen en el proceso inflamatorio. Los neutrófilos contienen lisosomas, con un contenido muy rico en enzimas hidrolíticas. Además, son capaces de generar una gran cantidad de radicales superóxido (O₂) los cuales destruyen a los agentes agresores (Kumar *et al.*, 2010). Los monocitos son células móviles de acción tardía, ya que actúan hasta varias horas después de que lo hagan los polimorfonucleares. Una vez en el tejido afectado, se transforman en macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar cualquier resto celular o bacteriano presente en el entorno (Gómez *et al.*, 2011).

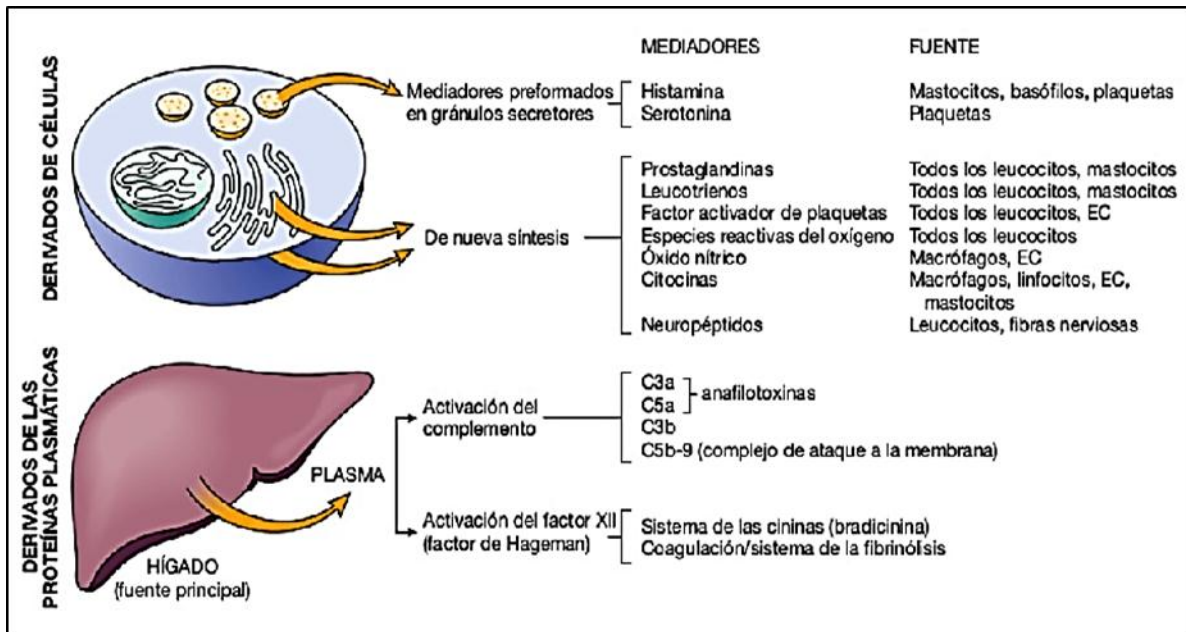


Figura 3 Respuesta inflamatoria (Kumar *et al.*, 2010)

2.3.2. Tipos de inflamación

Existen dos etapas o tipos de inflamación: la aguda y la crónica. La inflamación aguda se produce de manera rápida y por lo general dura pocas horas o incluso días, este tipo de inflamación se genera por la exudación de líquidos y proteínas plasmáticas (edema), así como la emigración de leucocitos (Fig. 4). En esta etapa puede ocurrir una reacción sistémica generalizada y dinámica, para conformar la resolución de la inflamación, ya que de no ser así la inflamación evoluciona a crónica (Kumar *et al.*, 2010; Abbas y Lichtman, 2009).

La inflamación crónica sucede cuando el estímulo inflamatorio es persistente, su duración es prolongada (semanas hasta meses) El infiltrado de células inmunes típico de la inflamación crónica está compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. La liberación crónica de mediadores de la

inflamación producirá lesión tisular, cicatrización y la posible pérdida de la función del tejido (Duarte *et al.*, 2009)

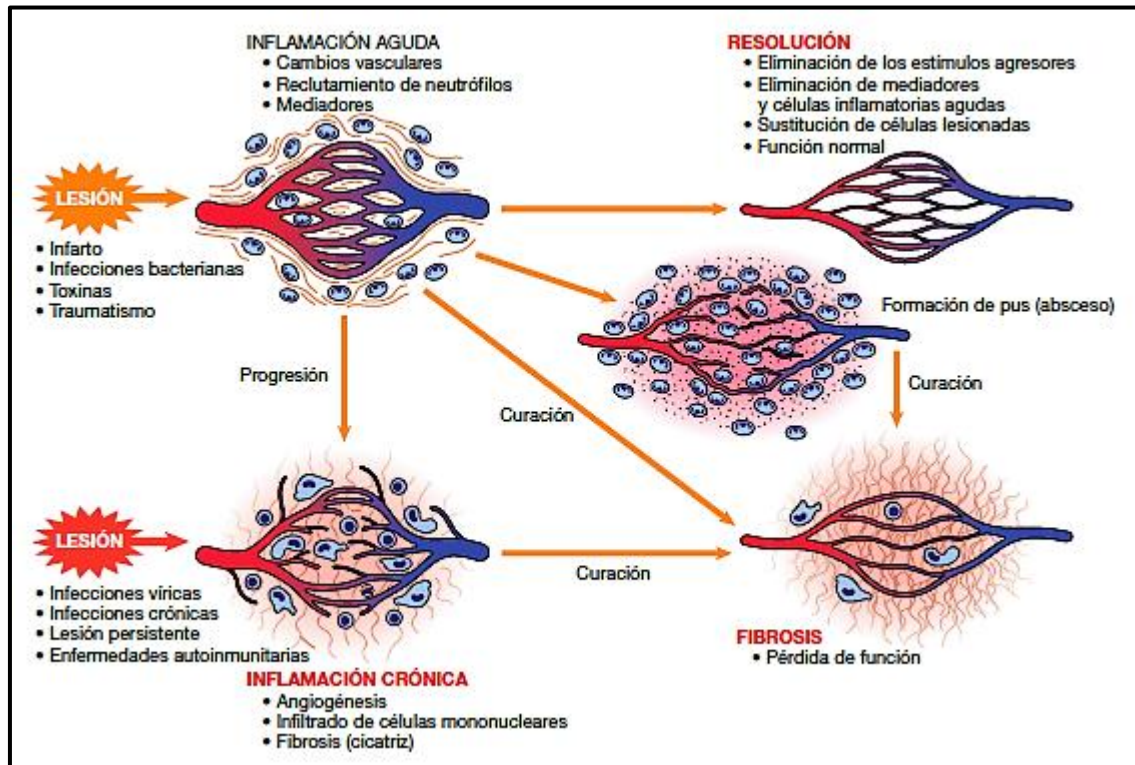


Figura 4. Características generales de los diferentes tipos de inflamación (Kumar *et al.*, 2010).

2.3.3. Antiinflamatorios No Esteroides (AINES) y su mecanismo de acción

En la actualidad los antiinflamatorios, según la naturaleza química se dividen en esteroidales y no esteroidales, siendo los últimos, los más utilizados en el tratamiento de numerosas condiciones convirtiéndose en el grupo terapéutico más utilizado (Mandell *et al.*, 2006).

Los antiinflamatorios no esteroidales inhiben la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX-1), disminuyendo la formación de prostaglandinas y tromboxanos

a partir del ácido araquidónico. La disminución en la síntesis de prostaglandinas (ya que estas generan dolor, inflamación, fiebre) es la responsable de la mayoría de los efectos terapéuticos de los AINES (Kumar *et al.*, 2010).

Mientras que la COX-1 tiene características de enzima constitutiva y es importante para el control de funciones fisiológicas, la COX-2 tiene características de enzima inducible en determinadas células, debido a circunstancias patológicas (citoquinas y mediadores de la inflamación COX-2) las cuales se encuentran mayormente en tejido dañado o inflamado. Los AINES tradicionales inhiben de manera no selectiva la actividad enzimática de las isoformas COX-1 y COX-2, o en todo caso en mayor medida de la COX-1 lo cual trae como consecuencia la aparición de efectos secundarios a nivel gastrointestinal, renal y de coagulación (Díaz *et al.*, 2009).

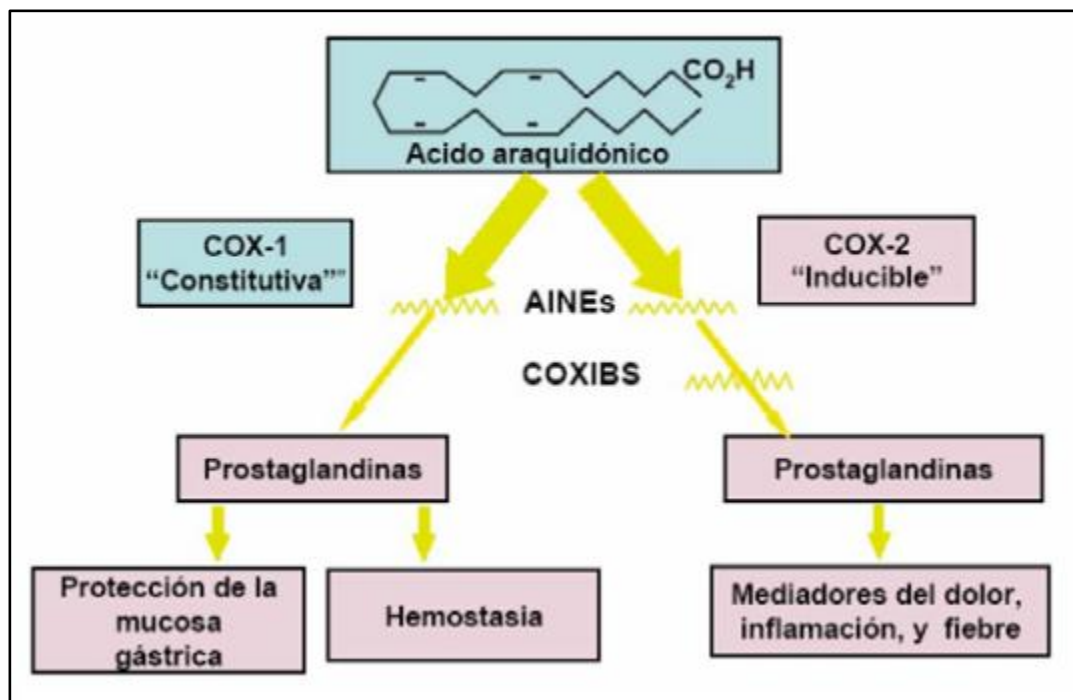


Diagrama 1 Principio general de la acción de la mayoría de los antiinflamatorios no esteroideos (Modificado de Rivera, 2006).

Todos los AINE tienen en común su mecanismo de acción: la mayoría de ellos actúa inhibiendo de forma estereoespecífica y competitiva la enzima ciclooxigenasa (COX). Algunos de ellos lo hacen de forma reversible, mientras que otros lo hacen de forma irreversible destruyendo la capacidad catalítica de la enzima que no podrá ser recuperada hasta que la célula sintetice sus nuevas moléculas. Cuanto más potente es la inhibición de la COX, mejor efecto antiinflamatorio. No obstante, la ciclooxigenasa es una enzima ubicua, presente en casi todas las células, siendo necesaria su mediación en la producción de ciertas prostaglandinas no inflamatorias que permitirán el correcto funcionamiento de muchos órganos y sistemas (Lacy *et al.*, 2013).

Tabla 5 Clasificación de Antiinflamatorios no esteroideos (Modificado de Lacy *et al.*, 2013)

Tipo de compuestos	Ejemplo de fármacos
Ácidos propiónicos	Ibuprofeno, Ketoprofeno, Naproxeno
Ácidos acéticos	Diclofenaco sódico, Etodolac, Indometacina, Ketorolaco
Ácidos antranílicos	Meclofenamato
Derivado del ácido salicílico	Diflunisal
Agentes no ácidos	Nabumetona
Oxicanes	Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam

2.3.3.1 Indometacina y su mecanismo de acción

La indometacina es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, posee propiedades analgésicas y antipiréticas (Narayanan *et al.*, 2000).

El mecanismo de acción de la indometacina se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y a la inhibición de la migración leucocitaria a las áreas inflamadas. Pero además otros mecanismos que contribuyen a su actividad antiinflamatoria son la inhibición de las fosfodiesterasas con el consiguiente aumento de las concentraciones intracelulares del adenosin monofosfato y la interferencia con la producción de anticuerpos inflamatorios. (Van *et al.*, 2000).

2.3.3.2. Métodos de evaluación de la actividad antiinflamatoria “*in vivo*”.

Para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* existen modelos que varían en la intensidad de la reacción. En el estudio de agentes antiinflamatorios se pueden seleccionar diferentes agentes irritantes que permiten un conocimiento más selectivo de la forma de actuar de la sustancia objeto de estudio. Dentro de los modelos de inflamación aguda se pueden emplear dos métodos (tabla 6), cada uno presenta características especiales dependiendo de las condiciones bajo las cuales se realice el estudio (González *et al.*, 2011).

Tabla 6 Métodos de evaluación *in vivo* para la determinación de procesos antiinflamatorios.

Método	Principio	Bibliografía
Edema plantar por carragenina	Administración subcutánea de una solución de carragenina a nivel de la aponeurosis plantar de rata o de ratón. Se puede administrar la muestra, por diferentes vías como intraperitoneal, oral u otras.	Chakraborty <i>et al.</i> , 2004
Edema auricular en ratón inducido por el 13-Acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA)	El TPA posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores. La aplicación del TPA desencadena el proceso inflamatorio: vasodilatación, eritema y edema. Se administra la muestra a evaluar por vía tópica.	Hetter, 2000.

2.3.3.3. Edema auricular en ratón inducido por acetato de tetradecanoil forbol (TPA).

Esta técnica se basa en el efecto de los ésteres de forbol que se extraen del aceite de crotón (*Croton tiglium* L.). El TPA es la más potente de las moléculas pro-inflamatorias con propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores. La aplicación del TPA desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación y eritema, extravasación y edema (Gómez *et al.*, 2011).

A nivel histológico, se produce: agregación plaquetaria, agregación y adherencia de compuestos polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos), migración a la dermis y degranulación de mastocitos. También, se observa la acumulación y migración de leucocitos al compartimiento subcorneal epitelial, particularmente alrededor de los folículos que degenera en la formación de abscesos subcorneales. A partir de 24 h aparece incremento de mitosis en la membrana basal epidérmica, lo que conlleva hiperplasia y engrosamiento epidérmico aparente (González *et al.*, 2011).

A nivel bioquímico, en minutos y hasta varias horas después, se elevan el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y las PGs E₁, E₂ y F₂. La síntesis proteica del ácido ribonucleico (RNA) y del ácido desoxirribonucleico (DNA) empieza a ser significativa a las 12 h y llega al máximo entre 48 h. La actividad del TPA parece implicar o ser independiente de la liberación y metabolismo del ácido araquidónico, lo que puede ocurrir simultáneamente con o casualmente subsecuente a la

interacción del TPA con un receptor de la proteína quinasa C (PKC) estimulándola de modo análogo al diacilglicerol, su agonista natural (González *et al.*, 2011).

2.4. Actividad oxidante

Se ha definido el daño o estrés oxidativo como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que rompen el equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar a ciertas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Carrillo, 2009; Martínez, 2007).

2.4.1. Radicales libres

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad. Molecularmente, son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación (Martínez, 2007).

Sin embargo, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales,

modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicáticas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS) (Tabla 7) (Hirst *et al.*, 2008).

Tabla 7 Principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes.

Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)	Enfermedades relacionadas	Bibliografía
Radical hidroxilo (HO)[•]	Cardiovasculares y Pulmonares	Gutiérrez, 2003
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	Proceso inflamatorio	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2000
Anión superóxido (O₂^{•-})	Diabetes y proceso inflamatorio	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2000
Oxido nítrico (NO)[•]	Hipertensión y proceso inflamatorio	Liu <i>et al.</i> , 2002
Peróxido (ROO)[•]	Preclamsia	Buhimschi y Weiner, 2001
Ozono (O₃)	Infecciones respiratorias y Enfermedades cardiovasculares	Lopez y Ballesteros, 2003

2.4.2. Actividad antioxidante

El daño oxidativo que caracteriza al estrés oxidativo (EO) ha sido ligado a diferentes enfermedades neurodegenerativas, procesos de isquemia-reperfusión e inflamación, entre otros (Feijóo *et al.*, 2010)

El concepto de antioxidante puede definirse como una sustancia que a ciertas concentraciones retrasa o previene la oxidación de un sustrato. De manera general los antioxidantes pueden actuar de la siguiente manera:

- Disminuir la concentración de oxidantes.
- Evitar la iniciación de la reacción en cadena atrapando a los primeros RL que se forman.
- Evitar la formación de ERO's al unirse a iones metálicos para transformar en productos menos reactivos.
- Detener la propagación y el aumento de RL (Hernández *et al.*, 2010).

Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos, revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas. El mecanismo más conocido se refiere a la capacidad que poseen algunos antioxidantes que actúan como estabilizadores o apagadores de diversas especies reactivas (Maldonado *et al.*, 2010).

En el caso de los radicales libres implica la estabilización, a través de un electrón a dicha especie reactiva, permite que el radical pierda su condición por apareamiento de su electrón desapareado. Otro mecanismo implica la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno contraponiendo la capacidad que tienen ciertos metales de transición como el hierro y cobre, de esta manera la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática (Hernández *et al.*, 2010).

2.4.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Los organismos aerobios disponen de defensas antioxidantes, para protegerse frente a la producción de radicales. Esencialmente, las defensas antioxidantes se dividen en dos grandes grupos: los enzimáticos y los no enzimáticos:

Los antioxidantes enzimáticos están presentes en el organismo de los seres vivos y protegen frente a los EROs producidos durante el metabolismo. Dentro de éstos tenemos 3 principales: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Drago *et al.*, 2006).

La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido, originando peróxido de hidrógeno. La CAT es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua, que está presente en la mayoría de las células eucariotas, localizándose a nivel de los peroxisomas. Por último, la GPX contribuye a la eliminación del peróxido de hidrógeno pero, a diferencia de la CAT, que usa el peróxido de hidrógeno como dador de electrones, utiliza el glutatión reducido (Clarkson yThompson, 2000).

2.4.2.2. Antioxidantes no enzimáticos

Están presentes en la dieta ingerida por los seres vivos, sobre todo en las frutas y verduras. Sus principales características son que son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula (cazadores estequiométricos), sólo actúan a concentraciones elevadas (Drago *et al.*, 2006).

Un primer grupo de antioxidantes no enzimáticos lo constituyen moléculas reductoras de pequeños tamaños e hidrosolubles. Dentro de ellas tenemos al glutati6n reducido y el ascorbato o vitamina C. Pueden actuar tanto como pro o antioxidantes, ya que pueden autooxidarse, especialmente en presencia de metales (Thair, 2005; Bertram y Bartsch, 2002).

Un segundo grupo de antioxidantes no enzimáticos son las vitaminas liposolubles. Aqu3 est3n el α -tocoferol o vitamina E, que es capaz de impedir las reacciones, en cadena producida por los radicales hidropoxilo durante la peroxidaci6n lip3dica as3 como la protecci6n que ofrece el α -caroteno. En la naturaleza se ha reportado que algunas plantas contienen polifenoles que muestran una gran capacidad para captar radicales libres, como es el caso de *Camellia sinensis* en particular el galato del epigalocatequina (EGCG), el cual se reporta con la mayor3a de los efectos protectores (Bertram y Bartsch, 2002).

2.4.2.3. Principales m3todos para la determinaci6n de actividad antioxidante.

Existen diferentes m3todos para evaluar la capacidad antioxidante, sin embargo no es posible utilizar un par3metro an3logo y relativamente simple para evaluarla, debido a que esta propiedad es generada por mol3culas de diversos tipos, con distinta relaci6n de estructura. Por ello, es recomendado utilizar m3s de un m3todo de determinaci6n de capacidad antioxidante (Tabla 8).

Tabla 8 Principales métodos de evaluación, para la determinación de la actividad antioxidante (Modificado de Fernández *et al.*, 2006).

Método	Descripción	Observaciones
Método (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS	Monitorea la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS.	Absorción máxima a 734 nm
Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	Monitorea por la disminución en su forma de radical libre, el DPPH, el cual sufre reducción.	Bajo requerimiento instrumental Absorbe a 515 nm
Método CARO (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)	Proporciona estimación de la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales.	No es muy certero
Método del poder antioxidante reductor férrico (CARF)	Mide la actividad antioxidante total y se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} .	Absorbe a 595 nm

2.4.2.4. Método ABTS [del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]

El ensayo ABTS mide la decoloración, de un radical ABTS, el cuál presenta un color verde intenso, el pico a la longitud de onda es 734 nm debido a la menor interferencia de otros pigmentos de las plantas. El ensayo ABTS mide la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (Ozgen *et al.*, 2006).

El ensayo ABTS se basa en la capacidad de captura que tiene el anión radical ABTS [del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] de vida larga. El ABTS es oxidado por los radicales peroxilo u otros oxidantes a su forma de radical catión ABTS el cual es de color intenso, y la capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se mide como inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con los antioxidantes (Miller, 1993; Rodríguez *et al.*, 2001).

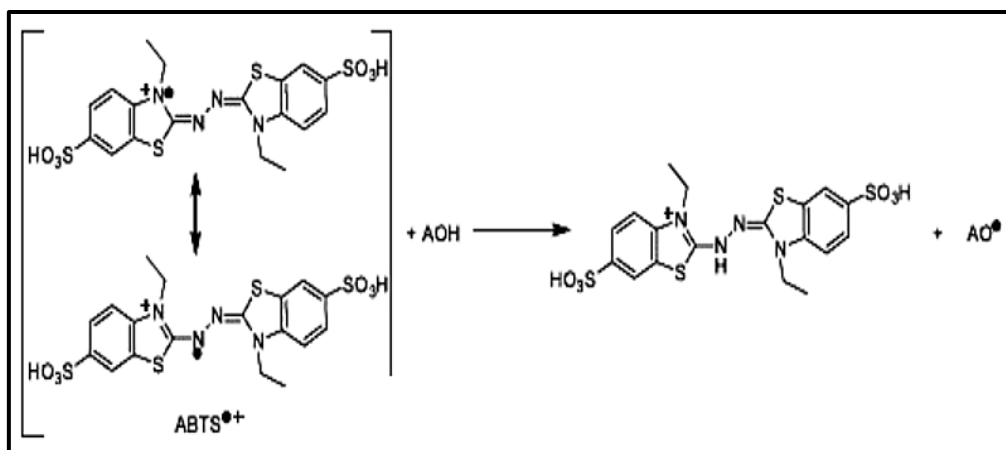


Figura 4 Proceso antioxidante generado por el radical ABTS (Ozgen *et al.*, 2006).

2.4.2.5. Método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

Se evalúa la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en una solución metanólica. La reducción del DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda estandarizada. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH proporciona un índice para estimar la

capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales (Carrillo, 2009; Williams y Cuvelier, 1995).

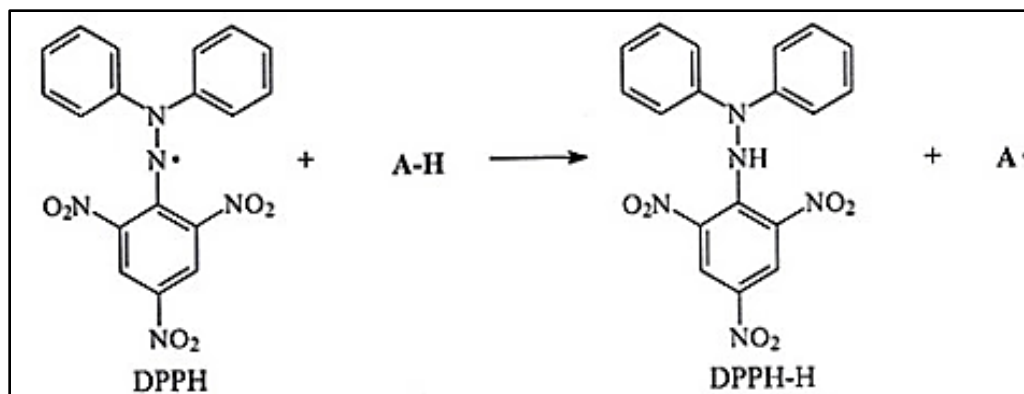


Figura 4 Estabilización de un radical libre mediante el método DPPH (Williams y Cuvelier, 1995).

2.4.2.6. Método del poder antioxidante reductor férrico (CARF).

El análisis de CARF se utiliza para medir la actividad antioxidante total y se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Este método fue modificado recientemente para su uso en microplacas de 96 pozos, dando una mejor reproducibilidad y un rendimiento de procesamiento más alto de muestras. El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}); formando un complejo azul (Benzie y Strain, 1996; Sánchez, 2002).

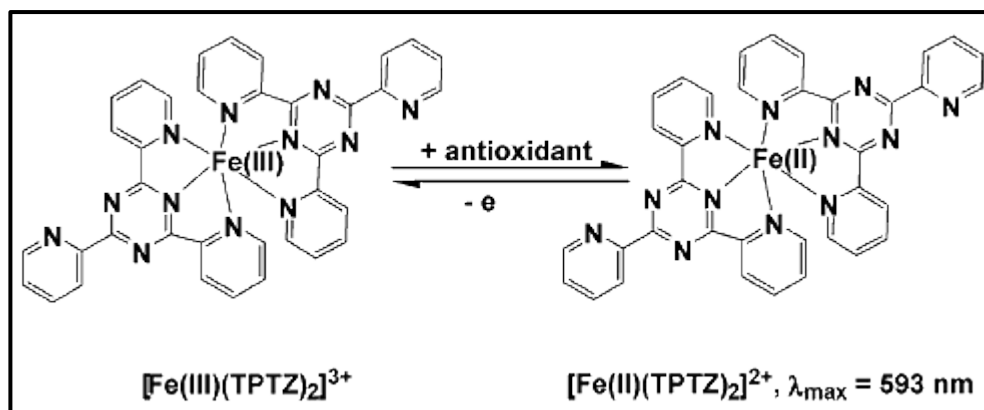


Figura 6 Reacción generada durante la reducción de Fe. (Benzie y Strain, 1996)

Una absorción alta, a una longitud de onda de 700 nm, indica un poder de reducción alto del fitoquímico, es decir una alta actividad antioxidante (Benzie y Strain, 1996; Sánchez, 2002).

2.4.3. Cromatografía Gases Masa (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica analítica ampliamente usada en la separación e identificación de compuestos orgánicos, volátiles o semivolátiles y térmicamente estables, presentes en una mezcla compleja. Esta técnica se basa en el empleo el punto de evaporación de cada compuesto (Rubinson y Rubinson, 2001).

La espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases resulta muy útil ya que se emplea como detector universal para la identificación de cada compuesto separado. La detección se realiza mediante el bombardeo con electrones o neutrones a los compuestos separados para generar de iones

estables que se cuantifican por su relación carga masa (Gutiérrez y Droguet, 2002).

El análisis de una mezcla de compuestos (extracto orgánico vegetal) por esta técnica se lleva a cabo mediante la inyección de una muestra en el cromatógrafo de gases, la cual inicialmente se volatiliza y posteriormente se conduce hacia una columna cromatográfica situada en un horno. Los componentes separados en relación con su punto de volatilización y su capacidad para tenerse en la columna por su afinidad a la misma, finalmente una a una pasan al espectrómetro de masas para ser convertidas en iones y fragmentadas, logrando ser identificadas de acuerdo a su relación masa/carga, creándose un espectro de fragmentación que se compara contra una librería o base de datos de compuestos previamente fragmentados (Skoog *et al.*, 2005; Silverstein *et al.*, 2005).

2.5. Medicina tradicional y su importancia en México.

La medicina tradicional forma parte de la cultura indígena y representa el conocimiento sobre el uso de las plantas medicinales y de otros productos naturales de los pueblos autóctonos, que contribuyen al fortalecimiento y conservación de su identidad. La medicina tradicional es todo un conjunto de conocimientos y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (Cruz, 2007).

En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional, donde se reportan 4500 especies de plantas, con propiedades medicinales. Sin embargo, sólo un 5% de estas plantas tienen una evaluación química, farmacológica y/o biomédica (Miranda *et al.*, 2012; Schlaepfer y Mendoza, 2010).

La medicina tradicional mexicana representa una opción de prevención y tratamiento de enfermedades para los habitantes de las comunidades originarias; esto se debe principalmente a problemas como la pobreza extrema y la falta de servicios de salud de estas comunidades. Sin embargo, la recolección, así como la venta de plantas medicinales representan generación de ingresos, principalmente de comunidades indígenas, quienes en la actualidad hacen uso de las mismas aprovechando las hojas, tallos, raíces, resinas, que son utilizadas como base para la elaboración de ungüentos, pomadas, aceites, tés y gotas, entre otros (Boege, 2008).

De acuerdo con estadísticas de la OMS, las plantas son utilizadas por 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas. Sin embargo, la lista de especies de uso tradicional incluidas en la Farmacopea Herbolaria Mexicana corresponde tan solo a cerca del 1% del total de la flora medicinal de México (Cortés, *et al.*, 2011).

2.5.1. Plantas medicinales en México y sus principales usos.

Existe diferentes formas en el uso de plantas medicinales para tratar diferentes padecimientos, como infusiones, cataplasmas, mediante baños,

pomadas, etc. Actualmente muchas de estas se aprovechan para elaborar medicamentos, colorantes, conservadores y cosméticos (López, 2002).

La comercialización de las plantas medicinales endémicas se encuentra en mercados locales, la cual tiene una alta demanda, por lo que la recolección de las mismas se ha convertido en una actividad generadora de ingresos, para familias mexicanas. Algunas de las principales plantas utilizadas y vendidas en México se muestran en la Tabla 9 las cuales tienen diversas propiedades terapéuticas (García *et al.*, 2012).

Tabla 9 Plantas medicinales comercializadas mayormente en zonas rurales de México (García *et al.*, 2012).

Nombre común	Nombre científico	Usos común
Árnica	<i>Heteroteca inuloides</i>	Desinflamante
Axihuitl	<i>Ageratina aschemborniana</i>	Cicatrizante, lavar heridas
Epazote	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Desparasitante
Laurel	<i>Litsea glaucescens</i>	Antirreumático
Menta	<i>Mentha spicata</i>	Auxiliar en la digestión
Pericón	<i>Tagetes lucida</i>	Diarrea
Ruda	<i>Ruta graveolens</i>	Relajante, contra el dolor
Sábila	<i>Aloe vera</i>	Cicatrizante, desinflamante
Sauco	<i>Sambucus mexicana</i>	Desinflamante

2.5.1.1. Uso etnobotánico de las plantas “Axihuitl”.

En el estado de Morelos se encuentra un conjunto de plantas conocidas comúnmente entre la población como “Axihuitl” o “hierba del golpe”, hierba

silvestre, que florece principalmente en los meses de noviembre a febrero, nativa de México. Son plantas que abundan en gran parte de los poblados por lo que son muy utilizadas por la mayoría de sus habitantes debido a que las consideran plantas curativas, fáciles de adquirir como consecuencia de su alta producción en la temporada de lluvias. Son arbustos de hasta 1.5 metros de altura; tallo erguido, muy ramificado, cilíndrico, café amarillento, a veces algo rojizo, glabro o ligeramente pubescente (Monroy y Castillo, 2010).

Utilizadas en la medicina tradicional mediante infusión, en té, hasta en tintura, estas plantas se emplean para sanar heridas y para desinfectarlas tanto en personas como en animales. En el estado de Morelos, el axihuitl también ha sido utilizado para aliviar dolores musculares tratar úlceras y gastritis. Cabe mencionar que lo que se utiliza principalmente son las hojas, sin embargo, en algunas localidades también se utilizan las flores, el tallo e incluso las raíces (Miranda, 2008). La clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 10, donde se puede observar que las especies conocidas como axihuitl pertenecen a la familia *Asteraceae (Compositae)*.

Tabla 10 Taxonomía tradicional del género *Ageratina* (Porrás, 2011).

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	Traqueobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae (Compositae)
Género	<i>Ageratina</i>
Especie	<i>A. aschemborniana</i> , <i>A. glabrata</i> , <i>A. pazcuarensis</i> .

2.6.1.2. Familia Asteraceae

La familia *Asteraceae* es un grupo altamente heterogéneo respecto a la morfología de sus partes vegetativas (raíces, tallos, hojas, etc.) también se considera una familia cosmopolita, debido a su distribución se puede localizar en casi todas las latitudes, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta las zonas altas, por lo tanto es posible encontrar a sus representantes en casi todos los tipos de vegetación y climas. La familia *Asteraceae* es uno de los grupos de plantas vasculares más grandes; se estima que a nivel mundial existen alrededor de 1535 géneros y de 23000 a 32000 especies (García *et al.*, 2014).

En México, se reportan alrededor de 362 géneros y 3351 especies de esta familia. Desde el punto de vista económico, tienen gran relevancia, ya que incluyen una gran variedad de usos como: plantas comestibles, ornamentales y medicinales, tales como: manzanilla (*Matricaria chamomilla*), artemisa (*Artemisia vulgaris*), axihuitl (*Ageratina aschemborniana*) por mencionar algunas (Tapia, 2010).

2.5.1.3. Género Ageratina

Anteriormente, muchas especies del género *Ageratina* formaban parte del género *Eupatorium* (King y Robinson, 1970), debido al estudio e información detallada de la anatomía floral, se realizó esta diferencia de género, la cual actualmente, se ha estudiado, reportado y aceptado por pruebas taxonómicas moleculares (Ito *et al.*, 2000). El género *Ageratina* posee una gran variedad de

especies, comprende 364 descritas (sinonimia) y sólo 265 aceptadas (García y Muñoz, 2010; Ito *et al.*, 2000).

El género *Ageratina* se describe como plantas anuales y arbustos que se caracterizan por crecer en regiones templadas del continente americano. Poseen inflorescencias que consisten en muchas flores rojas o blancas rosadas en capítulos, los tallos son muy arbolados. Las hojas son triangulares, serradas y opuestas. Los peciolo son algo largos y las hojas tienen un olor muy fuerte (García y Sánchez, 2014; Monroy y Castillo, 2010).



Figura 5 Aspecto de la planta del género *Ageratina aschenborniana*, en su hábitat natural.

En el Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), se encuentra reportado en su Herbario las especies del género *Ageratina* que se encuentran en el estado de Morelos (Tabla 11).

Tabla 11 Municipios del Estado de Morelos reportados con presencia de especies del género *Ageratina*.

No	Municipio	Especies de <i>Ageratina</i>
1	Huitzilac	<i>A. pazcuarensis</i> <i>A. ramireziorum</i>
2	Cuernavaca	<i>A. mairetianum</i>
3	Tepoztlán	<i>A. areolaris</i> <i>A. aschemborniana</i>
4	Tlayacapan	<i>A. mairetianum</i>
5	Tétela del Volcán	<i>A. conspicua</i> <i>A. oresbia</i>
6	Tlaquiltenango	<i>A. crassirameum</i> <i>A. monanthum</i>

En la figura 9 se observan los municipios de Morelos en donde se han reportado especies del género *Ageratina*, que va desde la zona norte hasta la zona sur, debido principalmente al clima, así como de su hidrosfera, ya que esta planta se localiza principalmente donde exista la presencia de agua.

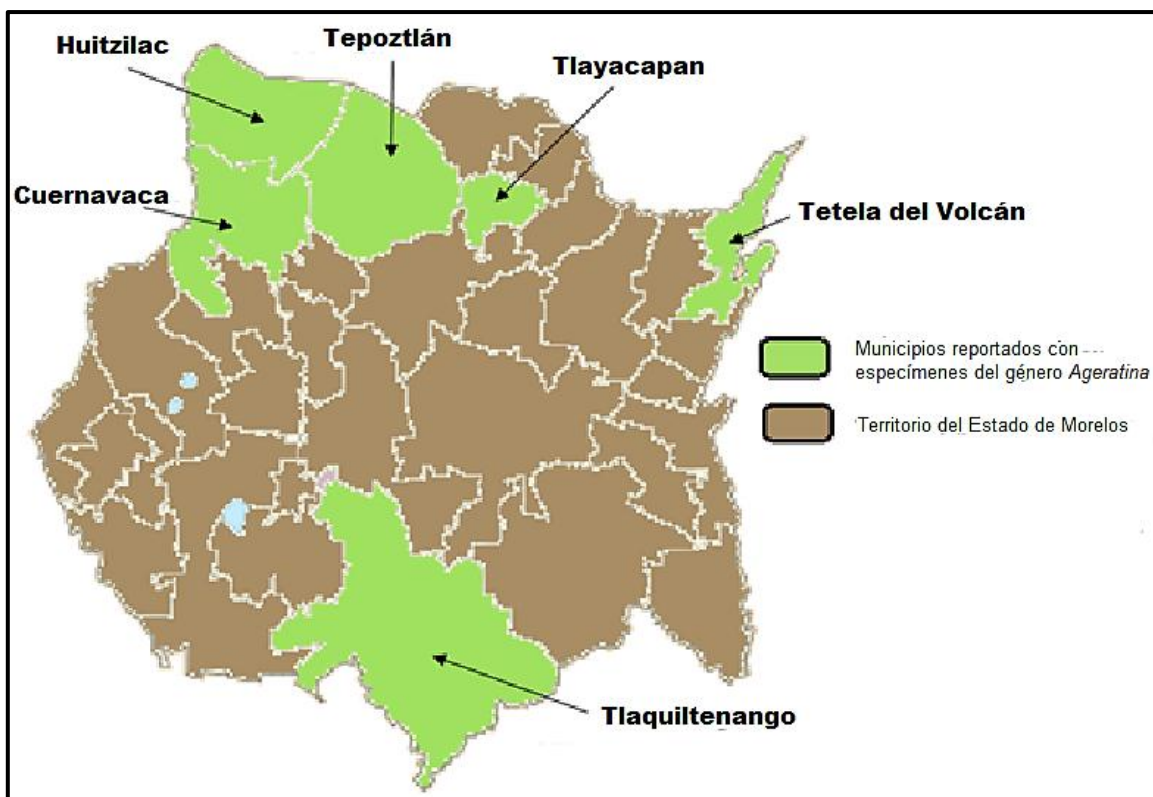


Figura 6 Distribución geográfica de Morelos, donde se localizaron especies de *Ageratina*.

2.5.1.4. Estudios biológicos del género *Ageratina*

Las plantas del género *Ageratina* se caracterizan por poseer gran variedad de metabolitos secundarios de importancia o aplicación farmacológica, industrial o biotecnológica. Sin embargo, debido a la sinonimia con el género *Eupatorium*, existen varios trabajos los cuales todavía están identificados como este género. Sin embargo, se han evaluado varias actividades farmacológicas como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12 Actividad farmacológica reportada de diferentes especies del género *Ageratina*.

Especie	Parte estudiada	Extracto	Evaluación Farmacológica	Técnica / microorganismo evaluados	Bibliografía
<i>A. pichinchensis</i>	Partes aéreas	Hexano:acetato de etilo	Antimicótico	<i>Candida albicans</i>	Romero et al., 2017
<i>A. adenophora</i>	Raíces	Etanol	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella dysenteriae</i>	Dong et al., 2017
<i>A. glabrata</i>	Hojas	Diclorometano	Antidiarreico		Bustos et al., 2016
<i>A. gracilis</i>	Hojas y flores	Etanol/ acetato de etilo	Antioxidante	DPPH	Vera, 2016
<i>A. pichinchensis</i>	Partes aéreas	Acetato de etilo	Estomatitis aftosa		Romero et al., 2015
<i>A. vacciniaefolia</i>	Partes aéreas	Etanol/Acetato de etilo	Antiinflamatoria	Edema plantar por carragenina	Hernández, 2014

Continuación

Especie	Parte estudiada	Extracto	Evaluación Farmacológica	Técnica / microorganismo evaluados	Bibliografía
<i>A. pichinchensis</i>	Hojas	Hexano	Gastroprotector		Sánchez <i>et al.</i> , 2013
<i>A. pichinchensis</i>	Partes aéreas	Extracto acuoso	Cicatrizante		Romero, <i>et al.</i> , 2013
<i>A. jahnii</i> y <i>A. pichinchensis</i>	Hojas	Agua (Hidrodestilación)	Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Torres <i>et al.</i> , 2013
<i>A. pichinchensis</i>	Partes aéreas	Hexano: acetato de etilo	Úlcera venosa crónica		Romero <i>et al.</i> , 2012
<i>A. sternbergiana</i>	Tallos	Etanol	Antiinflamatorio	Edema subplantar con albumina	León <i>et al.</i> , 2012
<i>A. pichinchensis</i>	Hojas y tallos	Hexano:acetato de etilo	Antimicótico	<i>Tinea pedis</i>	Romero <i>et al.</i> , 2012
<i>A. pichinchensis</i> var. <i>bustamenta</i>	Partes aéreas	Hexano	Antimicrobiana	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	Aguilar <i>et al.</i> , 2009

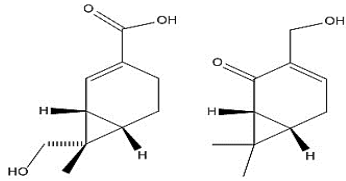
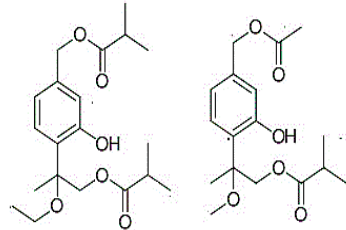
Continuación

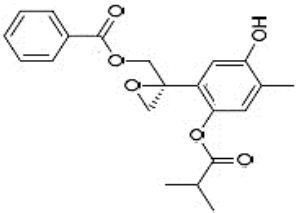
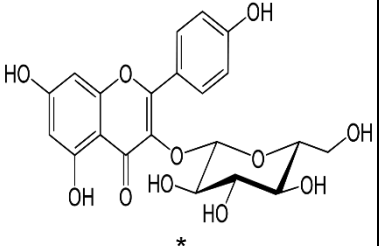
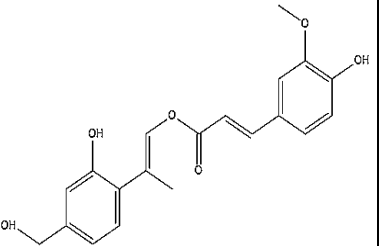
Especie	Parte estudiada	Extracto	Evaluación Farmacológica	Técnica / microorganismo evaluados	Bibliografía
<i>A. pichinchensis</i>	Partes aéreas	Hexano:acetato de etilo	Onicomiosis	<i>Trychophyton rubrum</i> <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	Romero <i>et al.</i> , 2009
<i>A. sternbergiana</i>	Tallos	Etanol	Antiinflamatorio	Edema subplantar con albumina	León <i>et al.</i> , 2012

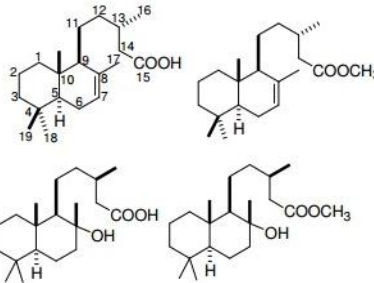
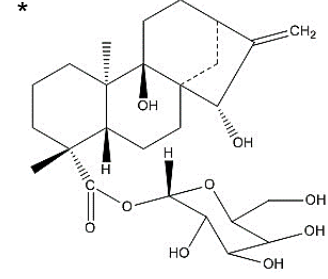
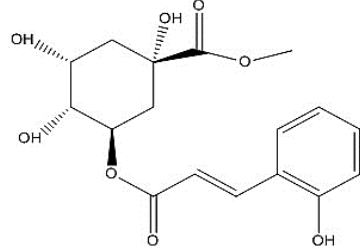
2.6.1.4. Estudios químicos del género *Ageratina*

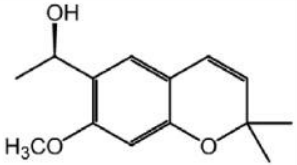
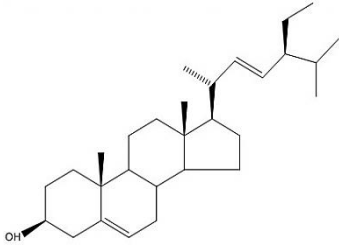
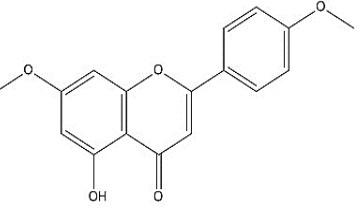
Dentro de este género se han aislado una amplia gama de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas entre los que destacan flavonoides y triterpenos.

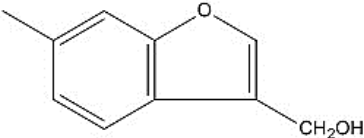
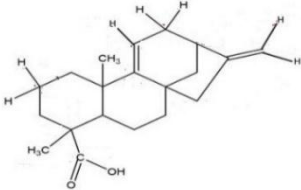
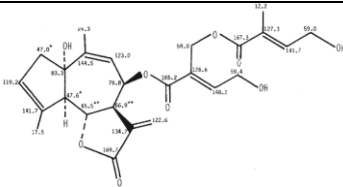
Tabla 13 Compuesto químicos realizados a diferentes especies del género *Ageratina*.

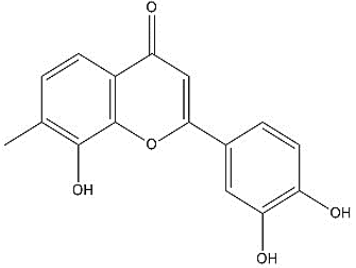
Especie	Parte estudiada	Tipo de extracto	Compuestos aislados	Estructura	Bibliografía
<i>A. adenophora</i>	Partes aéreas	Etanol	Monoterpeno: ácido (1 α , 6 α , 7 α) -8-hidroxi-2-careno-10-óico (1), ácido (1 α , 6 α) -10-hidroxi-3-careno-2-ona (-) – isocamínico (2).		Lin <i>et al.</i> , 2014
<i>A. adenophora</i>	Raíces	Etanol	Derivados del timol: 7,9-diisobutiriloxi-8-etoxitimol (1) y 7-acetoxi-8-metoxi-9-isobutiriloxitimol (2).		Dong <i>et al.</i> , 2017

Especie	Parte estudiada	Tipo de extracto	Compuestos aislados	Estructura	Bibliografía
<i>A. glabrata</i>	Hojas	Diclorometano	Derivado del timol: 10-Benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol isobutirato		Bustos <i>et al.</i> , 2016
<i>A. cylindrica</i>	Hojas	Extracto acuoso	Flavonoide: astragalina (1), Diterpenoide: paniculósido Glucósidos de ácido entaurenoico Ácido clorogénico L-ciroinositol		Bustos <i>et al.</i> , 2015
<i>A. adenophora</i>	Raíces	Etanol	Fenoles: 7-hidroxi-8,9-dehidrotimol 9-O-trans-ferulato (1), 7-hidroxitimol 9-O-trans-ferulato , 7,8-dihidroxitimol 9-O-trans-ferulato , 7,8-dihidroxitimol 9-O-cis-ferulato , metil (7R)-3-deoxi-4,5-epoxi-d-manno-2-octulosonato 8-O-trans-p-coumarato , metil (7R)-3-deoxi-4,5-epoxi-d-manno-2-octulosonato 8-O-cis-p-coumarato 3-(2-hidroxifenil)propil metil malonato.		Zhang <i>et al.</i> , 2013

Especie	Parte estudiada	Tipo de extracto	Compuestos aislados	Estructura	Bibliografía
<i>A. jocotepecana</i>	Hojas	Metanol	labdanos diterpenoides: Ácido (-) (5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oico (1), metil (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15 oato (2), ácido (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hidroxilabdan-15-oico (3), y (-)-(5S,9S,10S,13Z)-labda-7,13-dien-15-oico (4).		Bustos <i>et al.</i> , 2014
<i>A. vacciniaefolia</i>	Hojas y flores	Etanólico	Derivados del kaurano: (-)-b-D-18-glucopiranosil-9,15-dihidroxi kaurenoato (1), ácido (-)17-(bglucopiranosiloxil)-16-hidroxi-kauran-19-ico.		Torrenegra <i>et al.</i> , 1999
<i>A. adenophora</i>	Hojas y flores	Etanol	Derivados del ácido cumarínico: Acido 5-O-trans-o-coumaroilquinico metil ester (1), Ácido clorogénico metil ester macrantoin F, macrantoin G		Zhang <i>et al.</i> , 2013

Especie	Parte estudiada	Tipo de extracto	Compuestos aislados	Estructura	Bibliografía
<i>A. pichinchensis</i>	Partes aéreas	Extracto acuoso	Cumarina: 7-O-(β-D-glucopiranosil)-galactina		Romero, <i>et al.</i> , 2013
<i>A. pichinchensis var. bustamenta</i>	Partes aéreas	Hexano	Benzofuranos: 5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxisopropil)-2,3-dihidrobzofurano (1), 5-acetyl-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3-dihidrobzofurano. Esteroles: encecalinol, O-metilencecalinol, encecalina, sonorol, taraxerol, (+)-β-eudesmol, β-sitosterol y estigmasterol.		Aguilar <i>et al.</i> , 2009
<i>A. fastigata</i>	Hojas	Diclorometano	Flavonas metoxiladas: 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona (1). Derivados del kaurano: ent-kauran-16B-ol, entkauran-]6,20-diol.		Torrenegra <i>et al.</i> , 1995

Especie	Parte estudiada	Tipo de extracto	Compuestos aislados	Estructura	Bibliografía
<i>A. glechono. phylla</i>	Partes aéreas	Etanol	<p>Benzofuranos: 3-(hidroximetil)-6-metilbenzofurano (1), 3(ucetoximetil)-6-Meti-6enzofirano, 3-(isobutiri oximetil)-6-metiibenzofirano.</p> <p>Derivados del timol: 1,6-dihydroxy-4(14)-eudesmene (spathulenol), 3-(hydroxymethyl)-3-(acetoxymethyl)</p>		González <i>et al.</i> , 1989
<i>A. vacciniaefolia</i>	Partes aéreas	Etanol/Acetato de etilo	<p>Diterpenos tipo Kaurano: β-D-glucopiranosil (1), éster del Ácido (-)9, 15-dihidroxikaur-16-en-19-oico</p>		Hernández, 2014
<i>A. tomentella</i>	Partes aéreas	Diclorometano	<p>Lactonas sesquiterpénicas: acetato de hidrorilactona C, 5-desoxi-3-epi-4-hidroprovincialina, ácido 11,13-dehido-8β-tigloiloileman-12-oico y 8-epi-8-[5'-(4"-hidroxitigloiloxi)-tigloiloxi]-rupicolin A.</p>		Fang y Mabry, 1986

<i>A. calophylla</i>	Partes aéreas	Etanol	Flavonoides: 6,7-dimetoxi-3,5,3',4'-tetrahidroxiflavona, 3-O-apioside6-C-glucosilquercetina		Fang <i>et al.</i> , 1986
----------------------	---------------	--------	--	---	---------------------------

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones son un problema relevante en salud pública, puesto que se asocian a las altas tasas de morbilidad y mortalidad en el país y debido a los costos de atención. Por otro lado, la automedicación o mal manejo de los antimicrobianos, ha generado la resistencia de los microorganismos a los mismos, afectando así, la calidad de vida de las personas.

La medicina tradicional ha sido una alternativa viable, para el desarrollo de nuevos medicamentos. El estado de Morelos posee una amplia variedad de plantas con uso medicinal y entre ellas para este estudio destacan las utilizadas para tratar infecciones.

Las plantas conocidas como axihuitl (género *Ageratina*), son utilizadas en la medicina tradicional en el lavado de heridas (impidiendo que se infecte), así como para una mejor cicatrización, para infecciones gastrointestinales así como para respiratorias, úlcera gástrica y artritis, su utilización en cataplasma, macerado o té, es indistinto de las especies que se pueden localizar en las regiones.

Por ello es importante estudiar y corroborar su efecto terapéutico y propiedades farmacológicas asociadas con su uso en la medicina tradicional, de tal forma que se pueda respaldar con evidencia científica su uso, y a partir de ellas aislar e identificar nuevas o conocidas moléculas antimicrobianas. Además de contribuir al conocimiento de las especies endémicas del estado de Morelos.

4. HIPÓTESIS.

Tres especies del género *Ageratina* (*A. aschenborniana*, *A. glabrata*, *A. pazcuarensis*) conocidas como axihuitl en Morelos muestran actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y capacidad antioxidante.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante de tres especies del género *Ageratina* (*A. aschenborniana*, *A. glabrata*, *A. pazcuarensis*) del Estado de Morelos, conocidas en la medicina tradicional mexicana con el mismo nombre común de Axihuitl.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en placa de los extractos orgánicos de las tres especies seleccionadas (*aschenborniana*, *glabrata* y *pazcuarensis*) de *Ageratina*.
2. Determinar el porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria por el método de TPA en oreja de ratón de los extractos orgánicos de las tres especies seleccionadas de *Ageratina*.
3. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos orgánicos de las tres especies seleccionadas de *Ageratina* calculando la CI_{50} por los métodos DPPH, ABTS y CARF.

7. METODOLOGÍA

Se seleccionaron los municipios de la zona norte del estado de Morelos para recolectar axihuitl, debido a las condiciones óptimas de crecimiento de la planta, posteriormente fueron identificadas y agregadas a la colección del herbario del Centro de Investigación de Biodiversidad y Conservación (CIByC) en la UAEM, en los cuales se identificaron tres diferentes especies de *Ageratina*.

En el diagrama 2, se muestra la metodología en forma general para realizar el cernimiento biológico de las tres especies del género *Ageratina* seleccionadas para el presente estudio.

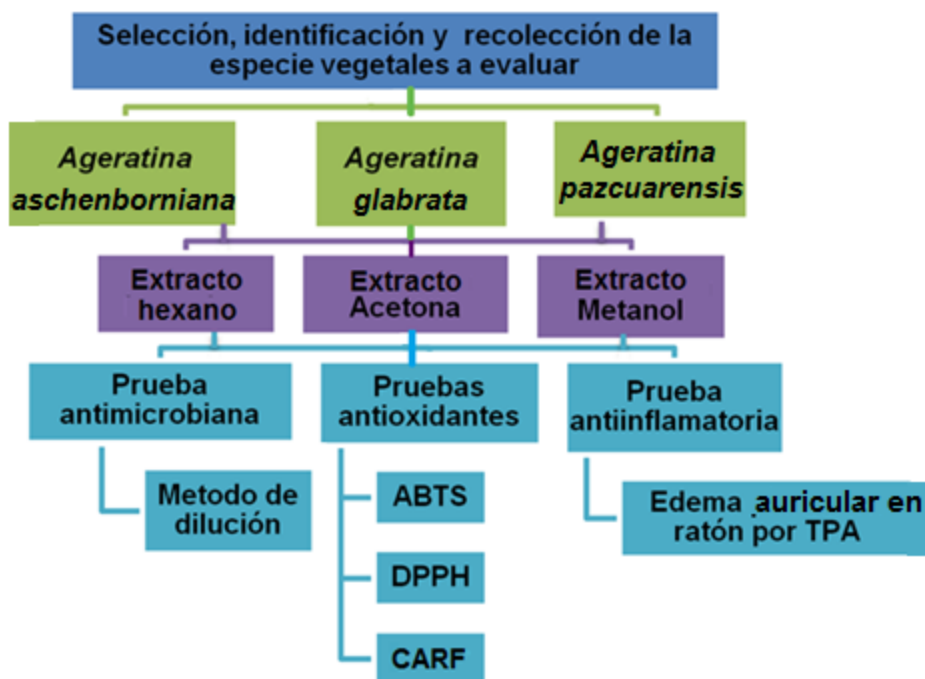


Diagrama 2 Metodología general del cernimiento biológico de tres especies del género *Ageratina*.

7.1. Selección y recolección de la especie vegetales a evaluar

Para la obtención de las especies vegetales se seleccionaron varios municipios del estado de Morelos entre ellos: Huitzilac, Tepoztlán, Tlalnepantla, Tlayacapan, Totolapan y Tetela del Volcán (Fig.10), en los cuales se realizó colecta de flor para identificación de especie taxonómica, que se realizó en el CIByC de la UAEM, por el M. en C. Gabriel Flores Franco. Se seleccionaron estos municipios debido al clima, el cual es propicio para el crecimiento de estas planta. Una vez determinadas las tres especies diferentes de *Ageratina* se realizó la colecta del material biológico (partes aéreas) entre los meses de mayo-junio del 2014, para la realización de las pruebas farmacológicas.

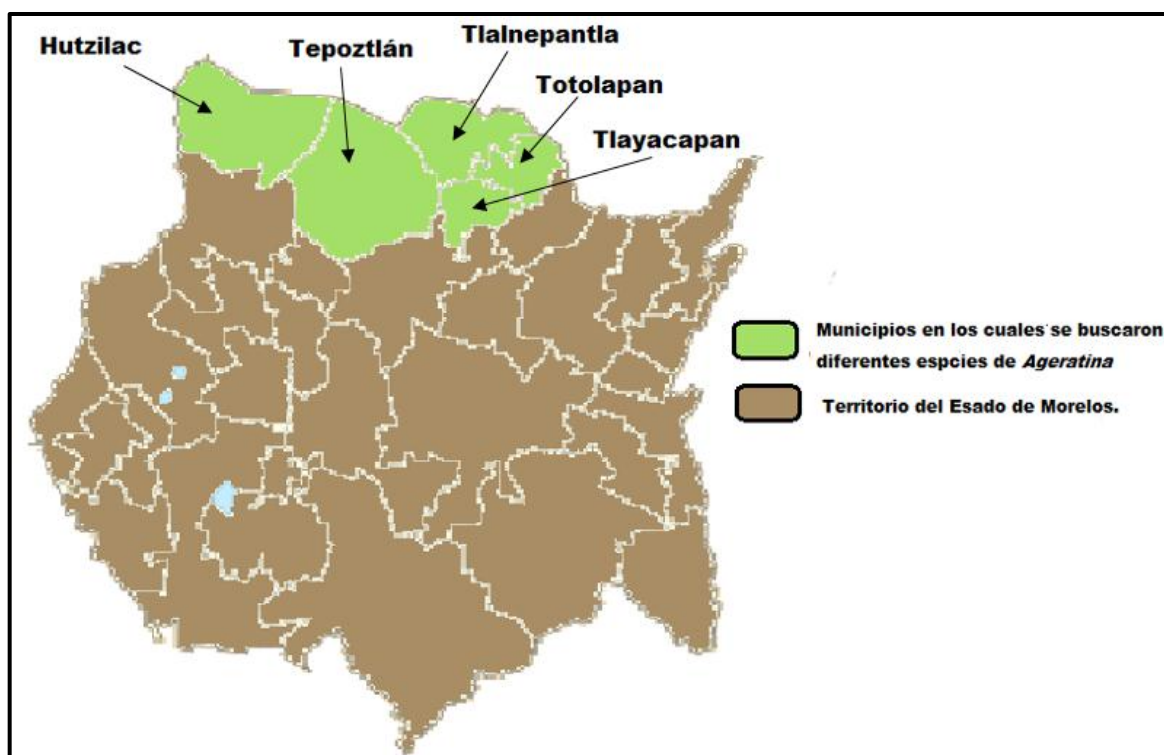


Figura 7 Distribución geográfica de los municipios que se seleccionaron para identificación de especies del género *Ageratina*.

7.2. Obtención de los extractos vegetales

El material vegetal fresco (partes aéreas) se dejó secar a temperatura ambiente y en ausencia directa de la luz natural (en sombra), durante un periodo de cuatro semanas. Posteriormente, el material seco se trituró manualmente y se realizó una maceración empleando disolventes orgánicos de polaridad creciente, en el orden en que se menciona: hexano, acetona y metanol.

El material vegetal permaneció en contacto con el solvente respectivo por un lapso de 72 horas por triplicado, una vez concluido este tiempo, se filtró el disolvente y se evaporó a presión reducida utilizando un rotaevapor marca Büchi R-200[®], a temperaturas menores de 60° C. Los tres residuos obtenidos después de la evaporación rotatoria con el mismo solvente, se reunieron para formar lo que se denominó extracto hexánico.

De acuerdo con la metodología anterior, se utilizó el mismo material vegetal para realizar la maceración con acetona, del cual se recuperó el extracto denominado como extracto acetónico y por último se empleó metanol, con el cual se obtuvo el extracto metanólico.

Esta metodología se siguió exactamente para la recuperación de los extractos de las diferentes especies obtenidas.

Una vez obtenidos los extractos se dejaron secar a temperatura ambiente, hasta tener peso constante para obtener el rendimiento de recuperación.

7.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Los microorganismos empleados para la determinación de la actividad antimicrobiana a evaluar, fueron seleccionados por tener mayor prevalencia en infecciones hospitalarias, un problema en salud pública a nivel nacional. También permitieron evaluar el rango de espectro de la actividad antimicrobiana de los extractos.

7.3.1. Método de microdilución en caldo para bacterias

La evaluación de actividad antimicrobiana se basó en el manual M7-A4 (Methodos for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically) del NCCLS (Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility) ahora conocido como CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

a) Preparación del extracto

Se utilizó DMSO (dimetil sulfóxido) al 100%, para solubilizar las muestras, la cantidad utilizada de DMSO no debe exceder el 10% respecto al volumen total de la solución stock.

Se utilizó Caldo Müeller Hilton (BDBixon), para llegar a las concentraciones correspondientes.

Se pesaron 10 mg de cada extracto a los cuales se les agregó 200 μ L de DMSO, obteniendo un volumen final de 2000 μ L con medio Müeller Hilton, se preparó una relación 1:10, obteniendo una solución stock de 5 mL del extracto a

una concentración de 1000 µg/mL, posteriormente se realizaron diluciones a partir de 1000 µg/mL hasta 1.95 µg/mL.

b) Preparación del inóculo para bacterias

Se cultivaron cepas ATCC de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. aureus* y *P. mirabilis* (otorgadas por el Dr. Oscar Torres Ángeles de la Facultad de Farmacia, UAEM) , en cajas petri de 20 mL de agar de tripticasa soya (BDBixon), dejándolas incubar durante 24 horas a 37° C.

Tabla 14 Microorganismos seleccionados para la evaluación antimicrobiana.

Grupo	Agente	ATCC
Bacterias Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23456
	<i>Proteus mirabilis</i>	23657
	<i>Escherichia coli</i>	25922
Bacterias Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	25953

El inóculo se preparó en tubos de ensayo donde se colocó solución salina al 0.85%, se tomaron dos colonias de cada cepa y se inoculó por picadura, llevando las muestras a una prueba de turbidez que corresponde al estándar 0.5 de la escala de McFarland (densidad óptica de 0.08-0.10 a 630 nm, equivalente a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL para la mayoría de los microorganismos). Se realizó un ajuste de cepa, haciendo una dilución 1:100, colocando 100 µL de las cepas a un volumen final de 10 mL de caldo Müeller Hinton, posteriormente se realizó otra dilución

1:20, colocando 500 µL de la cepa y obteniendo un volumen final de 10 mL con caldo Müeller Hinton, para tener un inóculo final de 7.5×10^5 UFC/mL.

a) Preparación de agentes antibacterianos

El agente antibacteriano que se utilizó en las pruebas como control positivo fue Trimetropim (160 mg) - Sulfametoxazol (800 mg) (BACTRIM – ROCHE) el cual se preparó a una concentración final de 53/266 µg/mL respectivamente, en la tabla 15, se pueden observar los rangos de Concentración Mínima Inhibitoria reportados por el CLSI contra los microorganismos de prueba.

Tabla 15 CIM de los microorganismos a evaluar reportada por el CLSI.

Antibiótico	CMI (µg/ mL)		Microorganismo
	S	R	
Trimetropim/ Sulfametoxazol 160mg/800mg	≤8/152	>2/38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	≤2/38	>4/76	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	≤2/38	>4/76	<i>Proteus mirabilis</i>
	≤2/38	>4/76	<i>Escherichia coli</i>
	≤2/38	>4/76	<i>Staphylococcus aureus</i>

b) Inoculación de microplaca

Se utilizaron placas ELISA de 96 pozos (Costar), la cual consta de doce columnas por ocho filas. Para la inoculación se prepararon las series de placas de modo que se comenzó con el primer pozo colocando 200 µL de extracto, haciendo 10 diluciones seriadas con Müeller Hinton, en la columna once se colocaron 100 µL de caldo Müeller Hinton y 100 µL de cepas de los microorganismos, como

control de crecimiento y en el pozo doce se colocaron 200 μL de caldo Müller Hinton, como control de esterilidad; se utilizó trimetoprim-sulfametoxazol como control positivo, colocándose como si fuera una muestra más, todo se realizó por triplicado (Fig. 11). Posteriormente se incubaron a 35 $^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, sin agitación.

Se realizó la lectura espectroscópica a las 24 h y posteriormente a las 48 h para determinar la CMI, en un espectrofotómetro ELX 808 BioTek a 630 nm.

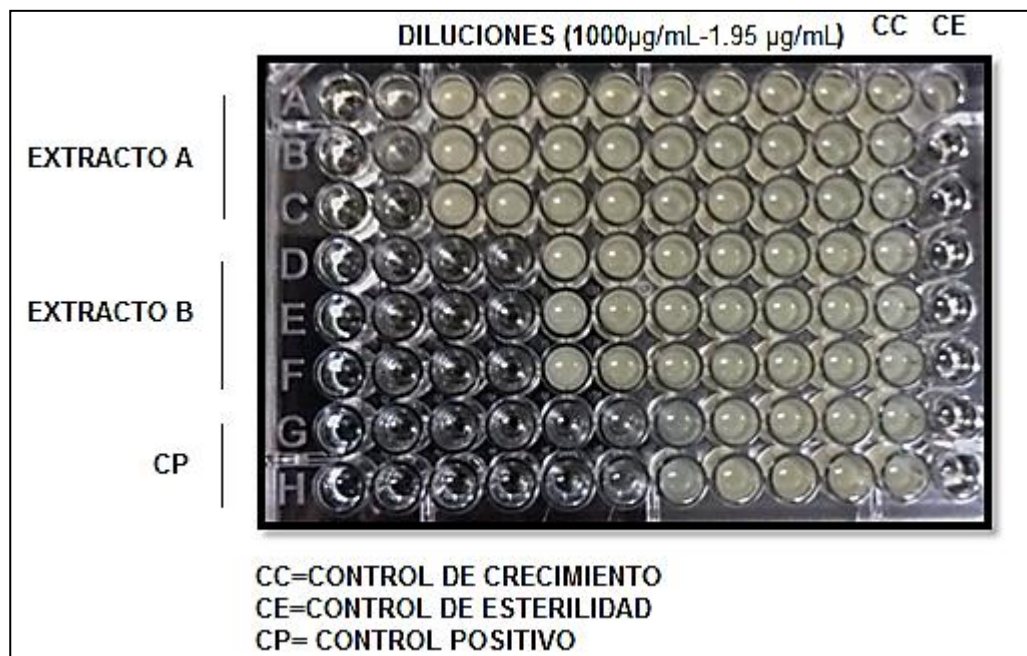


Figura 8 Esquema de la distribución de las muestras y controles para la evaluación antimicrobiana en placa.

7.3.2. Método de microdilución en caldo para levaduras

La evaluación de actividad antifúngica se basó en el manual M7-A2 (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts) del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

a) Preparación del extracto

Se utilizó DMSO al 100%, para solubilizar las muestras. Se utilizó RPMI 1640 (con glutamina sin bicarbonato y con rojo fenol como indicador de pH) (Microlab), para llegar a las concentraciones correspondientes.

Se pesaron 10 mg de cada extracto y se les agregó 200 μ L de DMSO, obteniendo un volumen final de 2000 μ L con medio RPMI 1640, se preparó una relación 1:10, obteniendo una solución stock de 5 mL del extracto a una concentración de 1000 μ g/mL, posteriormente se realizaron diluciones a partir de 1000 μ g/mL hasta 1.95 μ g/mL.

b) Preparación del inóculo para levaduras

Se cultivaron cepas de *Candida albicans* y *C. glabrata* (otorgadas por el Dr. Oscar Torres Ángeles de la Facultad de Farmacia, UAEM) en cajas Petri de 20 mL de agar dextrosa Sabouraud, dejándolas incubar durante 24 horas a 35 °C.

El inóculo se preparó en tubos de ensaye donde se colocó solución salina al 0.85%, se tomaron dos colonias de cada cepa y se inoculó por picadura, llevando las muestras a una prueba de turbidez que corresponde al estándar 0.5 de la escala de McFarland. Se realizó un ajuste de cepa, haciendo una dilución 1:100, colocando 100 μ L de las cepas a un volumen final de 10 mL de medio RPMI 1640,

posteriormente se realizó otra dilución 1:20, colocando 500 µL de la cepa y obteniendo un volumen final de 10 mL con medio RPMI 1640, para tener un inóculo final de 7.5×10^5 UFC/mL.

c) Preparación de agentes antifúngicos

Se utilizó fluconazol como agente antifúngico, el cual se preparó a una concentración final de 100 µg/mL. En la tabla 16 se pueden observar los rangos de Concentración Inhibitoria Mínima reportados por el CLSI.

Tabla 16 CMI de las levaduras a evaluar reportada por el CLSI.

Antibiótico	CMI (µg/ mL)		Microorganismo
	S	R	
Fluconazol	≤8	≥ 64	<i>C. albicans</i> , <i>C.glabrata</i>

d) Inoculación de microplaca

Se utilizaron placas de 96 pozos, para la inoculación se prepararon las series de placas de modo que se comenzó con el primer pozo colocando 200 µL de extracto, haciendo 10 diluciones seriadas con caldo RPMI 1640. En la columna once se colocaron 100 µL de medio RPMI 1640 y 100 µL de cepas de los microorganismos como control de crecimiento y en el pozo doce se colocaron 200 µL de medio RPMI 1640, como control de esterilidad. Se utilizó fluconazol (Lee Pharma) como control positivo, colocándose como si fuera una muestra más, todo se realizó por triplicado. Posteriormente se incubaron a 35 °C durante 48 horas y

se procede a su lectura a las 24 horas y a las 48 horas para determinar la CMI, en un espectrofotómetro ELX 808 BioTek a 630 nm. La CMI se define como la menor concentración de antibacteriano o antifúngico que inhibe completamente el crecimiento bacteriano y fúngico (no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo).

7.3.2.1. Interpretación de resultados

La cantidad de crecimiento en los pozos de las placas se analizaron las absorbancias mediante el programa Gen 5 version 2.04, en las lecturas realizadas en el espectrofotómetro para determinar el porcentaje de inhibición.

7.4. Actividad antiinflamatoria mediante edema inducido en oreja de ratón con TPA.

Para el ensayo de edema inducido en oreja de ratón con TPA se emplearon ratones machos de la cepa CD1 (25-30 g), criados en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM. Posteriormente se climatizaron en la Facultad de Farmacia durante 5 días. Los animales se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24°C, con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*. Posteriormente en las dos orejas se colocó tópicamente 5 µL de TPA (0.25 mg/mL), se dejó actuar durante 10 min a la oreja izquierda se colocó el control, se le administró 10µL de vehículo con el cual se disolvió el extracto. En la oreja derecha se aplicó 10 µL del extracto a una concentración de 0.1mg /oreja cada uno por cuadruplicado.

Cuatro horas después de la aplicación de las muestras, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para tomar una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. Se calculó la diferencia de peso entre oreja tratada y no tratada se expresaron los resultados como porcentaje de inhibición del edema calculado con siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{C-E}{C} \times 100$$

En donde:

C= Edema del grupo control (Tratado con TPA)

E= Edema del grupo tratado (TPA mas compuesto).

7.5.Evaluación de actividad antioxidante

7.5.1. Capacidad antioxidante por el método ABTS

La solución de ABTS se preparó poniendo a reaccionar 5 mL de una solución acuosa de ABTS [2,2-azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] 7 mM con 88 µL de una solución de persulfato de potasio 140 mM. Con la finalidad de oxidar la solución ABTS, esta se almacenó en la oscuridad por 16 horas. Posteriormente la solución se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia de 0.7. El ensayo se realizó en microplaca, las muestras de prueba se prepararon con 20 µL de la solución del extracto y 230 µL de la solución ABTS y el blanco se preparó con 20 µL, de metanol y 230 µL de ABTS. Para la determinación de la CI_{50} , se evaluaron cinco concentraciones diferentes por triplicado. El ensayo se realizó utilizando un lector de placas y se cuantificó a una longitud de onda de 734 nm, con una agitación de 5 segundos antes de la lectura.

7.5.2. Evaluación de la actividad antioxidante DPPH

La técnica se realizó en microplacas de 96 pozos con capacidad de 200 μL , utilizando la técnica de McDonald-Wicks *et al.*, 2006. Se preparó una solución metanólica de DPPH a una concentración 25 mg/L. En las placas a cada pozo se agregaron 175 μL de DPPH (0.025 mg/mL) con 25 μL de la muestra de prueba. Para la determinación de la CI_{50} se evaluaron diferentes concentraciones (5000, 2500, 1250, 625, 312.5 y 156.25 $\mu\text{g/mL}$) de cada extracto y cada concentración se evaluó por triplicado. Se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 515 nm. Se repitió la lectura después de 30 minutos. Todo el ensayo se llevó a cabo en la oscuridad, para evitar la decoloración del DPPH por efecto de la luz.

7.5.3. Actividad antioxidante reductora de hierro (CARF)

Se preparó una solución de 2,4,6,-Tris(2-piridil)-s-triasina (CARF, 10 mM) con 1 mL de una solución de cloruro férrico hexahidratado (20 mM) en 10 mL de un buffer de acetato (300 mM), ajustado a un pH de 3.6. La cuantificación de la actividad antioxidante se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos. Cada pozo contenía 50 μL de una solución de extracto a una concentración de 84 $\mu\text{g/mL}$ en mezcla de MeOH-Agua (1:1) a la cual posteriormente se le adicionó 175 μL de la solución de CARF, obteniéndose una concentración final de 20 μL de extracto por mL, esta determinación se realizó por triplicado. Para la determinación de la CI_{50} se evaluaron diferentes concentraciones de los extractos (5000, 2500, 1250, 625, 312.5 y 156.25 $\mu\text{g/mL}$) y cada concentración se evaluó por triplicado. En el caso

del blanco se utilizó una mezcla de 50 μL de metanol con 175 μL de la solución de CARF. La absorbancia de las muestras se midió a una onda de 595 nm en un espectrofotómetro Pekin-Elmer Lambda 40 UV/ Vis.

7.5.4. Cromatografía de Gases acoplada a Masas.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), se empleó para la separación y detección de los compuestos presentes en los extractos obtenidos. La separación se llevó a cabo usando un Cromatógrafo de gases Agilent 6890, serie GC System Plus, equipado con un detector Agilent 5973 Network, Mass Selective Detector. Se empleó una columna capilar de 5% fenil metil silicón, de 30 m de longitud y un diámetro de 250 μm con una pared de 0.25 μm .

Las muestras analizadas se prepararon a una concentración de 0.02 g/mL y se disolvieron en metanol grado analítico. La programación de la rampa de temperatura fue: T_{inc} 45 °C, T_{fin} 250 °C y un gradiente de 10 °C/min.

El patrón de fragmentación de los compuestos separados se comparó con la base de datos del mismo equipo, Mass Spectral Libraries N-15598, Rev. D 02.00.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El criterio de selección de las plantas conocidas como Axihuitl estudiadas en el presente proyecto, fue su uso en la medicina tradicional de Morelos. Posteriormente se investigó su nombre científico para su localización, recolección e identificación.

Se determinaron tres especies: *A. aschemborniana* del municipio de Tepoztlán; *A. glabrata* del municipio de Tlalnepantla y *A. pazcuarensis* del municipio de Huitzilac, la cuales fueron identificadas y agregadas a la colección del herbario del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) en la UAEM con los números de herbario 30224, 30226 y 30367 respectivamente, en la tabla 17 se resumen los datos de recolecta.

Tabla 17 Datos de recolecta y clasificación botánica de las especies de *Ageratina* estudiadas.

Especie	Localidad	Fecha de recolección	Recolectó	Autenticación botánica	No. Voucher
<i>A. aschemborniana</i>	Tepoztlán	2 junio 2014	Sarai Rojas Jiménez Marilem Rodríguez Labastida	M. en C. Gabriel Flores Franco	30224
<i>A. glabrata</i>	Tlalnepantla	5 septiembre 2014	Sarai Rojas Jiménez Luis F. Monroy Torres		30226
<i>A. pazcuarensis</i>	Huitzilac	21 marzo 2015	Sarai Rojas Jiménez Luis F. Monroy Torres		30367

El material vegetal (partes aéreas) de *A. aschemborniana*, del municipio de Tepoztlán (Latitud N=19° 1' 2.489 ", Longitud O = 99° 5' 30.642"), fue recolectado en las faldas de un cerro con abundante agua (Fig. 12), sin embargo se observaron estas plantas en todo el poblado, sobretodo en época de lluvias, debido al clima húmedo, florece dos veces por año. Esta planta se utiliza en esta región principalmente como cicatrizante y para evitar infecciones en heridas, mediante cataplasmas con una maceración previa en etanol, las parteras de la localidad lo utilizan para baños a las mujeres postparto, por los motivo anteriormente mencionados.



Figura 9 Lugar de recolecta de la especie *A. aschemborniana* (a), así como los arbustos (a) y flor (c) para su identificación taxonómica.

En el estado de Morelos el género *Ageratina* comunmente conocido como axhuitl, hierba del golpe o curalotodo, es muy utilizado por su abundancia, sin embargo *A. aschemborniana* es la especie que prevalece en el estado de Morelos, esto también se debe a la sinonimia en el nombre de la especie (*pichinchensis*, *adenophora*, *altissima*, *conspicua* y *oresbia*). De esta especie se han realizado evaluaciones para corroborar su utilización en la medicina tradicional.

En el 2009, Romero y colaboradores evaluaron las partes aéreas de *A. pichinchensis*, contra problemas de onicomicosis (*T. rubrum* y *T. mentagrophytes*) evaluando dos concentraciones de extracto puro (2.6 y 16.8%). La efectividad terapéutica obtenida por el extracto a un 12.6% de extracto de *A. pichinchensis* fue del 67.2%, mientras que la del 16.8% del extracto de *A. pichinchensis* fue del 79.1%. Por lo tanto ambas concentraciones de fitofármacos poseen altas tasas de eficacia en pacientes con onicomicosis, y la formulación con una concentración del 16,8% mostró una mayor eficacia.

Aguilar en el 2009 evaluó tres compuestos aislados de un extracto hexánico de *A. pichinchensis* var. *bustamenta*: enecalina, taraxerol y (β)-eudesmol; fueron evaluadas a concentraciones de 6.2 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra dermatofitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans* y *A. niger*, el mejor compuesto fue el taraxerol de las cuales se obtuvo una eficacia contra *T. mentagrophytes* con una MIC de 6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A. glabrata fue colectada en el Municipio de Tlalnepantla, en las orillas de un barranco (Latitud N=19° 0' 39.334", Longitud O= 98°99 ' 47.831"), el cual tiene agua en época de lluvias, con un ambiente húmedo todo el año. En estas localidades se utiliza principalmente contra úlceras gástricas mediante infusiones o masticando las hojas lavadas previamente; también se utiliza para dolores musculares, así como lavado de heridas, mediante una previa maceración con etanol. Cabe mencionar que no está reportado el crecimiento de esta especie en el estado de Morelos. En la figura 13 se observa el entorno en el que se encontraba nuestro material vegetal, así como las flores utilizada en su identificación.



Figura 10 Hábitat de la especie *A.glabrata*.

A. glabrata ha sido evaluada su efecto analgésico de un extracto diclorometánico por el método del plato caliente , esto debido a la relación de un

proceso inflamatorio y el dolor, ya que en la medicina tradicional el género *Ageratina* lo utilizan como desinflamatorio. Se obtuvo efecto a dosis de 100mg/Kg cinco horas después de la administración y la duración del efecto fue igualmente, de 5 horas (García *et al.*, 2011).

En el 2016, Bustos y colaboradores aislaron compuestos de un extracto diclorometánico de hojas de *A. glabrata* evaluandolos en contra de enfermedades diarreicas causadas por *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, de los siete compuestos aislados el 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol isobutirato fue el que mostró un mayor efecto con una CI_{50} de 0.84 y 24.2 μ M respectivamente.

A diferencia de las otras dos especies evaluadas, esta especie y su lugar de aislamiento no se encontraban registradas en el Herbario (CyBIC), por lo que fue un aporte para observar la biodiversidad de ese género en el estado de Morelos.

A. pazcuarensis fue identificada en el Municipio de Huitzilac (Latitud N=19° 2' 16.739", Longitud O=99°13' 53.075 "). Esta especie se colectó a bordo de carretera, existe en abundancia debido al clima frío y húmedo y lluvias en verano (Fig. 14). Las personas de esta localidad lo utilizan para lavar heridas, dolores musculares y también personas con artritis reumatoide, preparando una maceración en etanol o en pomada con cera de abeja.

A.pazcuarensis es una especie que no tiene estudios químicos ni biológico, por lo que es una aportación en el estudio de la flora del estado de Morelos.

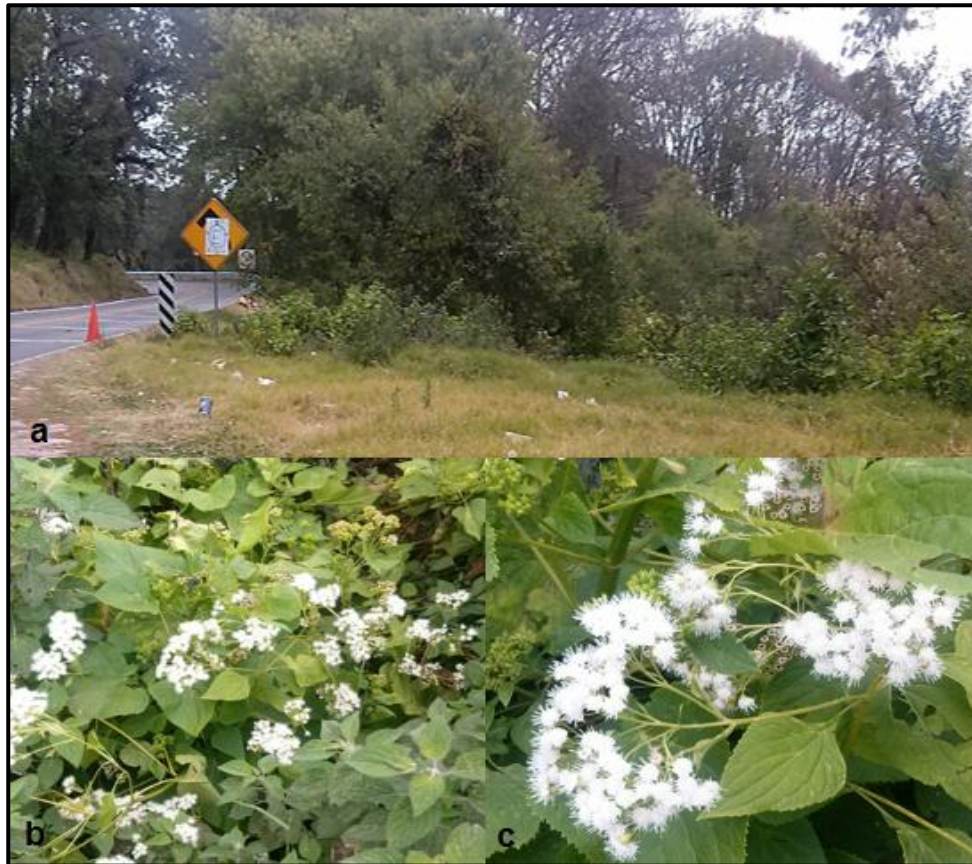


Figura 11 Lugar de colecta de *A. pazcuarensis* (a), así como su interacción con otros géneros (b) y su flor para su identificación taxonómica (c).

Sin embargo también han sido evaluadas otras actividades farmacológicas debido a su frecuente y muy conocidos usos tradicionales. Romero y colaboradores en el 2013 evaluaron un extracto de *A. pichinchensis* (en un modelo *in vitro*) su capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos de pulmón fetal humanos normales (MRC-5), el cual mostró efectividad terapéutica en el cien por ciento de los pacientes tratados con él, mientras que el tratamiento de control logró esta condición en el 81,8% que fue una fórmula de alginato de propilenglicol al 7%.

Sánchez y colaboradores en el 2013, evaluaron el compuesto 3,5-diprenil-4-hidroxiacetofeno, de *A. pichinchensis* en el modelo de lesión gástrica inducida por etanol, con una inhibición máxima de 75.59% de las úlceras a una dosis de 100mg / kg..

En la tabla 18 se muestran un resumen de los rendimientos de la extracción de las partes aéreas (tallos y hojas) de las especies recolectadas para el presente estudio.

Tabla 18 Rendimiento de extractos de las diferentes especies del género *Ageratina* en Morelos.

Espece Vegetal	Material Vegetal (g)	Tipo de extracto	Peso de Extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>A. aschemborniana</i>	217.6	Hexano	9.6	4.4
		Acetona	12.2	5.6
		Metanol	34	15.6
<i>A. glabrata</i>	248.6	Hexano	14.6	5.9
		Acetona	9.2	3.7
		Metanol	34.4	13.8
<i>A. pazcuarensis</i>	128.5	Hexano	0.6	0.4
		Acetona	2.4	1.9
		Metanol	6	4.7

El rendimiento de los extractos es importante, debido a que una fuente con principios activos como las plantas, determina la rentabilidad de una especie vegetal. En este estudio se obtuvo un rendimiento de 0.4-15.6 %, los extractos

metanólicos fueron los que presentaron el mayor rendimiento, sobre todo en la especie *A. aschemborniana*.

Esto puede deberse a la polaridad del solvente, ya que le confiere propiedades de solubilización, por lo que generalmente, el disolvente suele tener características químicas y estructurales similares a las del compuesto a disolver, observando que tenemos compuestos mayoritariamente polares (Ringuelet y Viña, 2013).

8.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las especies de *Ageratina*.

La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de dilución en placa de los diferentes extractos, en la tabla 19 se muestran los controles establecidos por el CLSI así como los obtenidos en los ensayos.

Tabla 19 Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los diferentes antimicrobianos sobre los microorganismos evaluados reportados por el CLSI y los obtenidos como control.

Antimicrobiano	CMI (µg/ mL)		Microorganismo	CMI (µg/ mL)
	S	R		
Trimetoprim/ Sulfametoxazol 160/800mg	≤8/152	>2/38	<i>P. aeruginosa</i>	26.5/133
	≤2/38	>4/76	<i>K. pneumoniae</i>	53/266
	≤2/38	>4/76	<i>P. mirabilis</i>	3.31/16.62
	≤2/38	>4/76	<i>E. coli</i>	3.31/16.62
	≤2/38	>4/76	<i>S. aureus</i>	0.20/1.04
Fluconazol	≤8	≥ 64	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	8

Las concentraciones obtenidas para *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* son mayores que las establecidas por el CLSI, lo cual puede indicar la existencia de una resistencia de estos microorganismos.

En el año 2011 Paciel y colaboradores realizaron un estudio acerca del problema de farmacoresistencia, encontrando que *P.aeruginosas* y *K. pneumoniae*, eran resistente debido a la presencia de lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión o por la pérdida de porinas, haciendo ineficaces a fármacos como las cefalosporinas y penicilinas.

Considerando también que la OMS, a principios del año 2017, emitió una lista de bacterias con farmacoresistencia, entre ellas destacan: *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, entre otras.

En la tabla 20 se observan las CMI obtenidas para los diferentes extractos de las tres especies de *Ageratinas* evaluadas a las 24 hr de incubación. Los extractos de la especie *A. pazcuarensis* tuvieron porcentajes de inhibición mínimas a las concentraciones y microorganismos que se evaluaron, por lo que se sugiere que no son activos.

Tabla 20 CMI ($\mu\text{g/mL}$) de los diferentes extractos orgánicos evaluados contra diferentes microorganismos a las 24 h de incubación.

Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)												
Microorganismos		<i>A. aschemborniana</i>			<i>A. glabrata</i>			<i>A. pazcuarensis</i>			Control (Trimetroprim sulfametoxazol)	Control (Fluconazol)
		H	A	M	H	A	M	H	A	M		
Bacterias Gram (-)	<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	250	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	26.5/133	
	<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	500	250	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	53/266	
	<i>P. mirabilis</i>	>1000	>1000	>1000	250	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	3.31/16.62	
	<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	250	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	3.31/16.62	
Bacteria Gram (+)	<i>S. aureus</i>	>1000	4	>1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0.20/1.04	
Levaduras	<i>C. albicans</i>	4	32	16	32	32	32	>1000	>1000	>1000		8
	<i>C. glabrata</i>	125	250	>1000	>1000	>1000	125	>1000	>1000	>1000		2

H=Hexano, A= Acetona, M=Metanol

El extracto hexánico de *A. glabrata* presentó inhibición contra la mayoría de las cepas a excepción de *C. glabrata*; contra las bacterias Gram – (*P. aeruginosas*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *E. coli*) presentó un CMI de 250 µg/mL, mientras que con la Gram + (*S. aureus*) presentó una CMI de 125 µg/mL. Lo interesante es lo antes mencionado de la farmacoresistencia de *K. pneumoniae* y *P. aureginosas*, ya que el extracto héxanico inhibe este tipo de bacterias,

A. aschemborniana tuvo un importante efecto contra levaduras, sobre todo contra *C. albicans* (4 a 32 µg/mL).

Comparando el valor de CMI de los extractos contra bacterias y levaduras, se puede observar que hay una mejor inhibición contra levaduras, con valores de CMI menores como el extracto hexánico de *A. aschemborniana* (CMI= 4 µg/mL) contra *C. albicans*.

Para la evaluación contra levaduras, los extractos orgánicos de *A. aschemborniana* y *A. glabrata* inhibieron el crecimiento tanto de *C. grabrata* como de *C. albicans*, siendo el extracto más activo el hexánico de *A. aschemborniana* con una CMI de 4 µg/mL, lo que corrobora estudios realizados anteriormente contra infecciones por *Candida*.

En el caso de bacterias, Torres y colaboradores en 2013 evaluaron aceites esenciales de *A. jahnii* y *A. pichinchensis*, contra las bacterias *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, donde solo obtuvieron efecto contra *S. aureus* con CMI de 49.5 mg/mL de *A. jahnii* y 104 mg/mL de *A. pichinchensis* y para *E. faecalis* obtuvieron efecto de CMI de 49.5 mg/mL de *A.*

jahnii y 104 mg/mL de *A. pichinchensis*, sin embargo estos resultados, solo nos pueden dar un panorama general, ya que las concentraciones son muy altas, lo que indica una actividad antimicrobiana pobre.

Dong y colaboradores en 2017 evaluaron compuestos puros de *A. adenophora* de un extracto etanólico, contra *S. aureus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *E. coli* y *S. dysenteriae*. El compuesto mas activo fue (1 α ,6 α)-10-hidroxicar-3-ene-2-ona con CMI de 15.6, 31.3, 15.6, y 6.25 μ g /mL, respectivamente.

De las evaluaciones realizados anteriormente del género *Ageratina* contra levaduras, Rios y colaboradores en el 2003 aislaron un compuesto puros (encecalinol) de *Eupatorium aschembornianum* (ahora *A. aschemborniana*), obtenido de un extracto hexánico y evaluándolo contra varios dermatofitos (*T. mentagrophytes*, *T. rubrus*, *A. niger* y *C. albicans*), resultando una CMI de 100 μ g /mL contra *C. albicans*.

En el 2009 Aguilar y colaboradores evaluaron compuestos puros de *A. pichinchensis* var. *bustamenta* aislados de un extracto hexánico, contra los dermatofitos antes mencionados. El taraxerol fue el compuesto mas activo contra *C. albicans*, con una CMI de 25 μ g /mL.

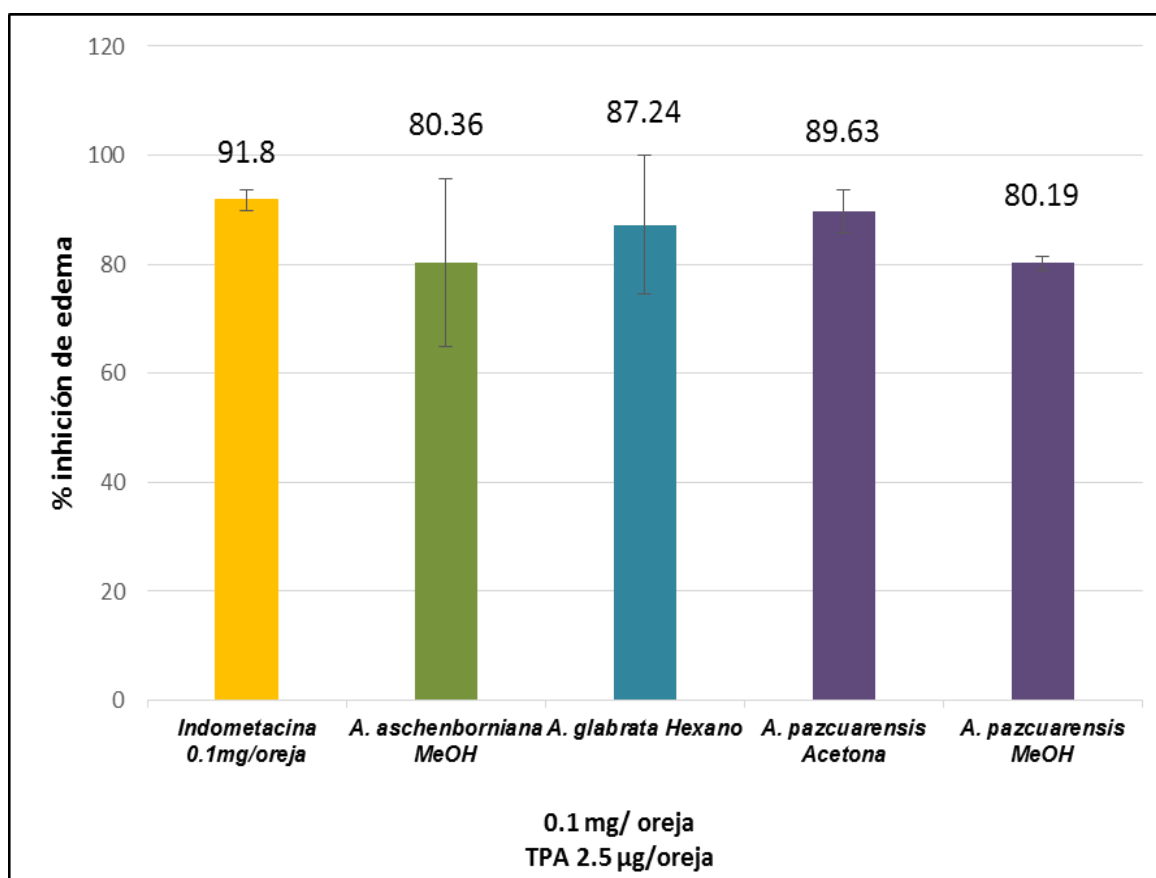
Romero y colaboradores evaluaron un extracto estandarizado al 7% de encecalina de *A. pichinchensis* contra *C. albicans* (2017), presentando una efectividad del 86.6%, en una candidiasis diagnosticada .

En el género *Candida* se pueden encontrar diferentes formas clínicas, como cutáneas en forma exógenas, mucocutáneas de manera endógena o en casos

extremos candidiasis sistémica invasiva (Rippon, 2011; del Palacio y Alhambra, 2009). En la medicina tradicional el axihuitl se utilizan en heridas (lavados, cataplasmas o pomadas), de forma exógena o endógena siendo ingeridas las hojas de la planta o en infusiones. Los resultados de los estudios realizadas en el presente trabajo, se corrobora la actividad antimicótica de esta planta, tomando en cuenta que son extractos y no compuestos puros como en algunos casos.

8.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de las especies de *Ageratina*.

Se realizó una evaluación antiinflamatoria en el modelo murino de edema auricular inducido con TPA de los extractos de las tres especies de *Ageratina*, teniendo como control indometacina, todos los extractos y el control positivo fueron evaluados a una concentración de 0.1 mg/oreja. En la gráfica 3 se muestran sólo los extractos que presentaron actividad.



Gráfica 3. Porcentajes de inhibición de los extractos activos del género *Ageratina* a una concentración de 0.1mg/oreja de TPA. Se reporta $\bar{X} \pm DE$, un análisis de varianza y prueba post hoc HSD o de Tukey y de Dunnet, $p < 0.05$, $n=5$.

Las tres especies del género *Ageratina* presentaron actividad antiinflamatoria, que fueron variables dependiendo del tipo de extracto. El extracto metanólico de *A. aschemborniana* tuvo una inhibición del 80.36%, mientras que sólo el extracto hexánico de *A. glabrata* presentó inhibición de 87.24 %. Los extractos acetónico y metanólico de *A. pazcuarensis* mostraron un porcentaje de inhibición de 89.63 % y 80.19% respectivamente.

El análisis estadístico mostró que *A. aschemborniana* y *A. glabrata* tienen una diferencia significativa. Con una confianza del 95% el extracto metanólico de *A. aschemborniana* fue menos activo que el hexánico de *A. glabrata*. Por otra parte *A. glabrata* con respecto a los extractos de *A. pazcuarensis* y el control no mostró diferencias significativas en el porcentaje de actividad obtenida. Por lo que los extractos de *A. glabrata* y *A. pazcuarensis* tienen un efecto inflamatorio mayor que el de *A. aschemborniana*. Se puede concluir que las tres especies de *Ageratina* evaluadas tienen actividad antiinflamatoria, sin embargo mientras que los en las especies *A. aschemborniana* y *A. pazcuarensis* al parecer los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria son de carácter polar, en el caso de la especie *A. glabrata* al parecer los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria son de carácter no polar.

León en el 2012 evaluó la actividad antiinflamatoria mediante el método del edema subplantar en ratón de un extracto etanólico de tallos de *A. sternbergiana* a dosis de 50 mg / Kg, 100 mg / Kg, y 200 mg / Kg. Se determinó que el efecto antiinflamatorio a dosis de 200 mg/Kg es el que evidencia una mejor respuesta antiinflamatoria en animales evaluados.

Hernández y colaboradores en el 2014 evaluaron *A. vacciniaefolia* con un extracto etanólico por el método de edema plantar por carragenina con diclofenaco como control a una concentración de 100 mg/kg, obteniendo un 89% de inhibición a las 5 hrs de la inducción de inflamación.

Estas evaluaciones resultan importantes, debido a que nuestra concentración de extracto fue mucho menor, respetando los modelos de evaluación de una actividad inflamatoria aguda, sin embargo se destaca que estas especies, así como las que evaluamos presentan actividad antiinflamatoria.

El axihuitl se utiliza en la medicina tradicional para para contrarrestar efectos de una úlcera gástrica, cuya etiología se relaciona con la presencia de *H. pylori* (Silva *et al.*, 2010; Gamboa, 2003) y como consecuencia un proceso inflamatorio.

Sánchez y colaboradores en el 2010 realizaron un estudio bio-dirigido de la fracción hexánica de *A. pichinchensis*, obteniendo una molécula activa denominada enecanesina, evaluándolo como un gastroprotector, mostrando un porcentaje de inhibición ulcerosa de $85.65 \pm 4.76\%$ a la concentración de 100 mg/kg, con un mejor efecto que carbenoxolona e indometacina usados como control.

Otro de los usos en la medicina tradicional del axihuitl es la utilización en la artritis reumatoide, en donde el sistema inmunológico confunde a los tejidos propios del cuerpo con tejidos extraños y responde con la inflamación. La

inflamación no se puede controlar, lo que trae como consecuencia un mayor daño de los tejidos, huesos y articulaciones (Neira y Ortega, 2006).

No se han reportado estudio enfocados a este tipo de inflamación sin embargo se han realizado estudios que como este muestran el efecto antiinflamatoria de estas plantas.

. Sin embargo la actividad se presentó en extractos de diferentes polaridades, lo que indica que la naturaleza química de los compuestos responsables de la actividad en las tres especies es diferente.

8.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de las especies de *Ageratina*.

En la tabla 21 se muestran los resultados de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los diferentes extractos de las tres especies del género *Ageratina*. En este experimento se utilizó extracto estandarizado de *Camellia sinensis* [94% de galato de epigallocatequina (EGCG)] y trolox como control positivo.

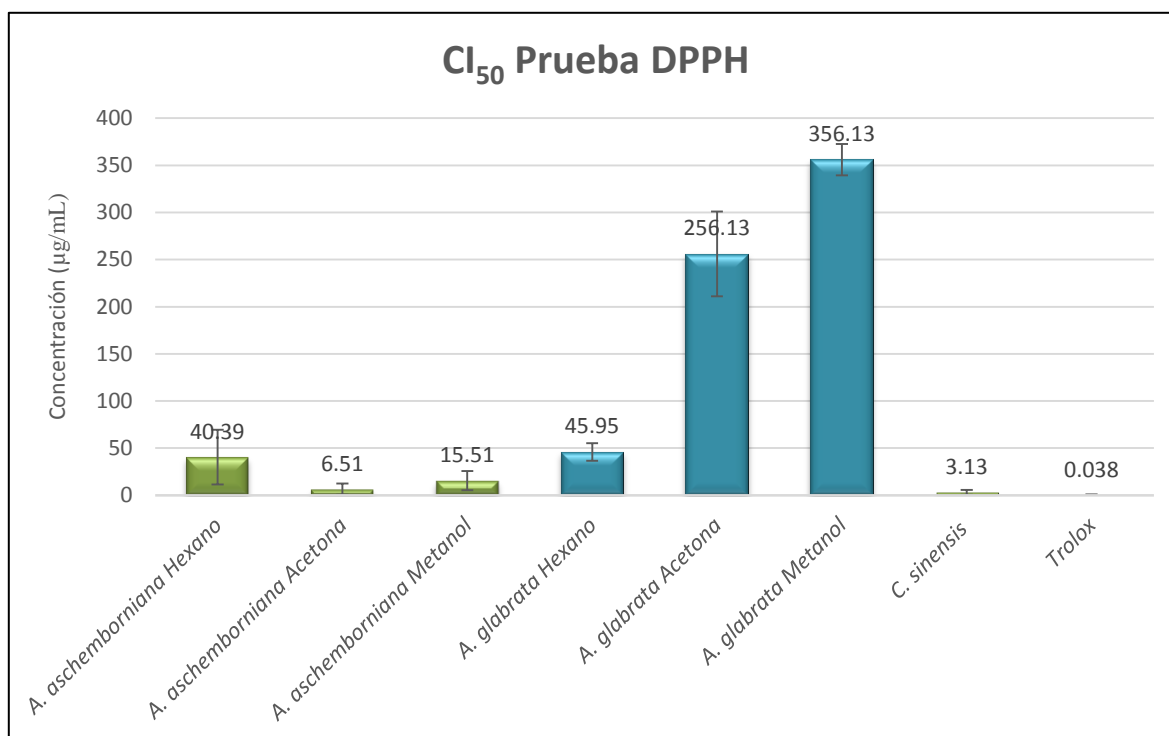
Tabla 21 Concentración Inhibitoria Media de los extractos orgánicos de las tres especies de *Ageratina*, por los metodos ABTS y DPPH. Se reporta \bar{p} promedio \pm DE.

MUESTRAS		ABTS	DPPH
		CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>A. aschemborniana</i>	Hexano	S/A	40.39 \pm 2.13
	Acetona	1193.14 \pm 3.03	6.51\pm1.53
	Metanol	S/A	15.51 \pm 2.08
<i>A. glabrata</i>	Hexano	S/A	47.96 \pm 3.56
	Acetona	S/A	256.13 \pm 2.73
	Metanol	S/A	516.94 \pm 5.34
<i>A. pazcuarensis</i>	Hexano	594.96	S/A
	Acetona	S/A	S/A
	Metanol	S/A	S/A
<i>C. sinensis</i> (estandarizado a 94% de EGCG)	-	3.13	3.04
Trolox	-	0.038	0.036

Se observó que la capacidad antioxidante de los extractos orgánicos de las especies de *Ageratina* evaluadas, es débil en comparación con los estándares, con excepción del extracto acetónico de *A. aschemborniana*, el cual tuvo una CI_{50} de $6.51 \mu\text{g/mL}$ en la prueba con DPPH. Estos resultados permiten suponer que los compuestos responsables de esta actividad antioxidante son polares, muy probablemente compuestos de tipo fenólico, algunos de los cuales han sido previamente aislados en el género *Ageratina* (Zhong *et al.*, 2013).

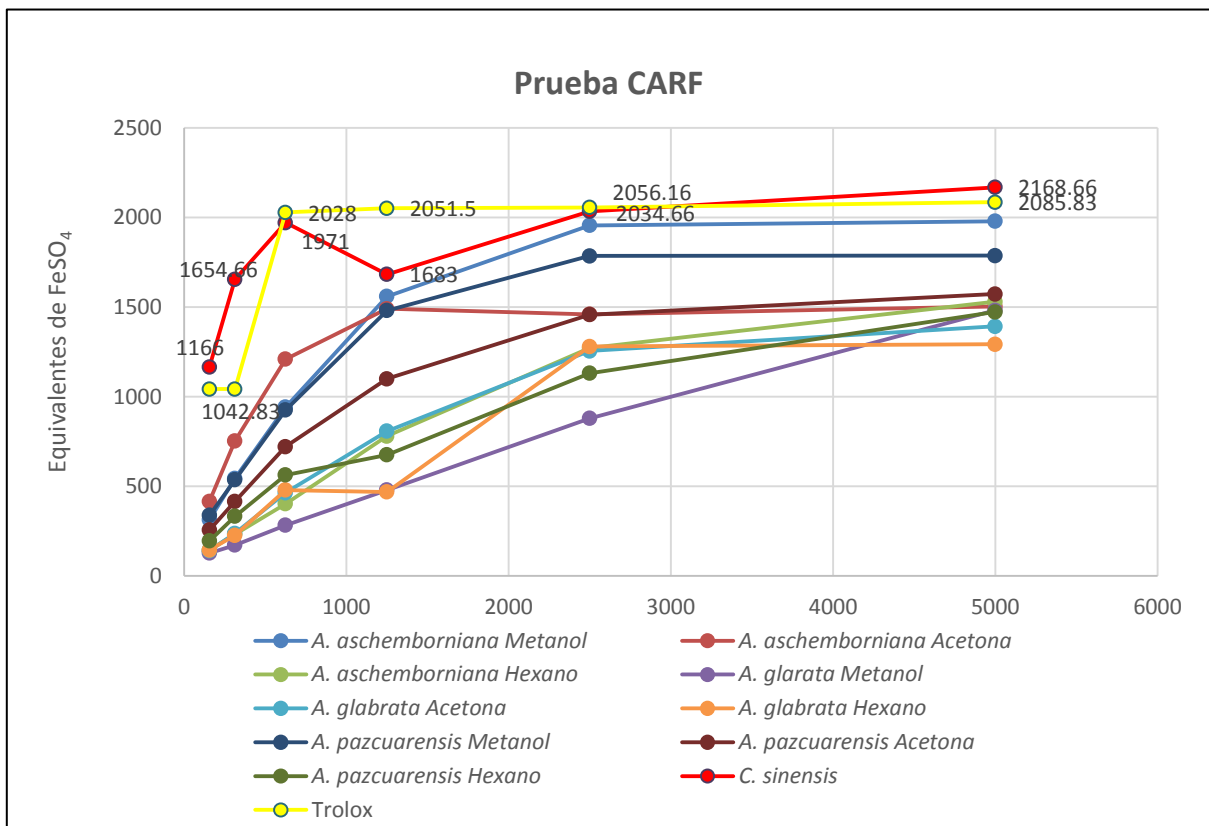
En la grafica 4, se observa los extractos de *A. aschemborniana* (acetona con 6.51 ± 1.53 y metanol con $15.51 \pm 2.08 \mu\text{g/mL}$) obtuvieron una concentración inhibitoria importante en el método DPPH. Sin embargo no se compara con la actividad de nuestros controles, la cual es mayor. El DPPH solo puede medirse en un medio orgánico, lo cual permite la interpretación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos posibles en nuestra muestra (Surveswaran *et al.*, 2007).

Por otro lado el método ABTS puede ser disuelto en un medio orgánico u acuoso, puede medirse su actividad antioxidante teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra (Wojdylo *et al.*, 2007). El conjunto de estas técnicas nos dan un panorama de la actividad antioxidante, podría ser una razón para la diferencia presentada en nuestros resultados.



Gráfica 4 Concentraciones Inhibitorias Medias de los extractos activos de las diferentes especies de *Ageratina* evaluadas con controles *C. sinensis* y trolox. Se reporta \bar{x} promedio \pm DE.

La capacidad antioxidante reductora de hierro se observa en la gráfica 5, que en comparación de los controles tampoco mostraron una gran actividad, a excepción de los extractos metanólicos de *A. aschemborniana* y *A. pazcuarensis*.



Gráfica 5 Equivalentes de FeSO₄ con respecto a las concentraciones evaluadas (5000-156.25 µg/mL), de los diferentes extractos de las diferentes especies de *Ageratina* estudiadas.

Mostraron actividad antioxidante los extractos metanólicos de *A. aschborniana* y *A. pazcuarensis* a una concentración de 2500 µg/mL presentando 2034.66 y 1785.66 equivalentes de FeSO₄ respectivamente. Estos resultados fueron cercanos a lo presentado con nuestros controles, mientras que los otros extractos se encontraron por debajo de la mitad de los equivalentes mostrados por estos mismos. Se concluye que los extractos evaluados en el presente trabajo no son buenos donadores de electrones, pero si antirradicalarios, en el caso de los dos extractos mencionados con actividad y que los compuestos implicados en este tipo de actividad pueden ser de carácter polares.

Vera en el 2016 evaluó la actividad de un extractos etanólicos de hojas y flores de *A. graccii* como antioxidante por el método DPPH, obteniendo un extracto activo denominado F4 con CI_{50} de 1,55 mg/L, observando que las concentraciones son demasiadas altas, porlo que confirma que porlomenos los extractos y comouestos evaluados no poseen una alta actividad antioxidante.

8.4. Cromatografía de gases acoplado a masas

El análisis del contenido químico se realizó únicamente para los extractos que mostraron mejor actividad en alguna de las pruebas biológicas realizada. donde algunos de ellos mostraron actividad para más de dos de los bioensayos. Un total de cinco extractos fueron analizados por GC-MS: acetónico de *A. aschemborniana*; extractos hexánico y acetónico de *A. glabrata* y extractos hexánico y acetónico de *A. pazcuarensis*.

El análisis de GC-MS de estos extractos permitió separar e identificar a los compuestos mayoritarios que se encuentran presentes en cada extracto activo de las especies de *Ageratina* evaluadas. Para lo cual fueron considerados los siguientes tres criterios.

- 1) Compuestos separados para cada extracto y que presentaron los picos con mayores áreas bajo la curva y con mayor porcentaje de área con respecto porcentaje total de todos los picos.
- 2) Los patrones de fragmentación de los componentes de cada extracto que presentaron un porcentaje similar o superior al 95 % con respecto al patrón de fragmentación del compuesto estándar incluido en la base de datos del equipo.
- 3) Realización de la búsqueda bibliográfica de cada compuesto mayoritario separado, fragmentado e identificado, que exhibiera reportes previos de su existencia como producto natural.

Aquellos componentes separados que tuvieron baja coincidencia de fragmentación con respecto al compuesto patrón y/o que no fueran propiamente

un producto natural fueron considerados como no identificados (NI), evitando así incluir falsos positivos (“artefactos”) en los resultados.

A través de este análisis comparativo fue posible identificar para el extracto acetónico de *A. aschemborniana* trece compuestos, siendo tres los componentes mayoritarios. El patrón de fragmentación que permitió identificar a los compuestos se presenta en la tabla 22.

Tabla 22 Contenido químico del extracto acetónico de *A. aschemborniana* por GC-MS

Compuesto (% de abundancia, identificación*)	t _r (min)	[M] ⁺	Fragmentación MS
Cariofileno (0.43 %, 1)	13.43	204	189, 175, 161, 147, 133, 119, 105, 93, 79, 69, 55 y 41
Espatulenol (0.52 %, 2)	15.40	220	205, 202, 187, 177, 159, 147, 131, 119, 105, 91, 79, 69, 55, 43.
3,3,5,6,7-pentametil, 1-indonona (4.16, 3)	16.22	202	187, 171, 159, 144, 128, 115, 101, 91, 77, 72, 63, 43
β-Eudesmol (3.81 %, 4)	16.26	222	204, 189, 175, 164, 149, 135, 122, 108, 93, 77, 67, 59, 41
7-(1,1-dimetil-etil)-2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-inden-1-ona (11.80 %, 5)	16.50	216	201, 185, 171, 158, 141, 128, 115, 103, 93, 86, 79, 69, 63, 51.
3,5-diter-butilo del ácido benzoico (13.06 %, 6)	17.94	234	219, 201, 189, 175, 161, 144, 115, 102, 91, 77, 59, 43
p-octil acetofenona (4.08 %, 7)	18.54	232	217, 201, 174, 160, 145, 134, 115, 101, 91, 77, 57, 43
N-[(3-nitrofenil) metilen]-2-propanamina (4.08 %, 8)	18.85	192	177, 161, 147, 134, 119, 104, 91, 77, 63, 51, 43
2,3,5,6-tetrahidro-3,3,4,5,5,8-hexametil-S-indaceno-1,7-diona (5.32 %, 9)	20.41	270	255, 239, 219, 197, 1953, 141, 128, 115, 105, 91, 77, 63, 53, 43
(19.48 %, NI)	21.88	272	
Estigmastan-5,22-dien-3-ol (1.59 %, 10)	35.90	412	397, 369, 351, 300, 271, 255, 229, 213, 159, 133, 83, 69, 55, 43
(7-hidroxy-5-methoxy-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-il)-etanona-1 (1.40%, 11)	16.94	248	223, 217, 203, 159, 128, 109, 91, 77, 69, 51
3,8-dimetil-4-(1-metil-etilideno) (8S-cis)-2,4,6,7,8,8a-hexahidro 5(1H)-azulenona (4.47 %, 12)	23.59	218	203, 175, 149, 133, 119, 105, 91, 77, 55, 44

tr = tiempo de retención, [M⁺] masa del ion molecular, *estructura química en la figura 15

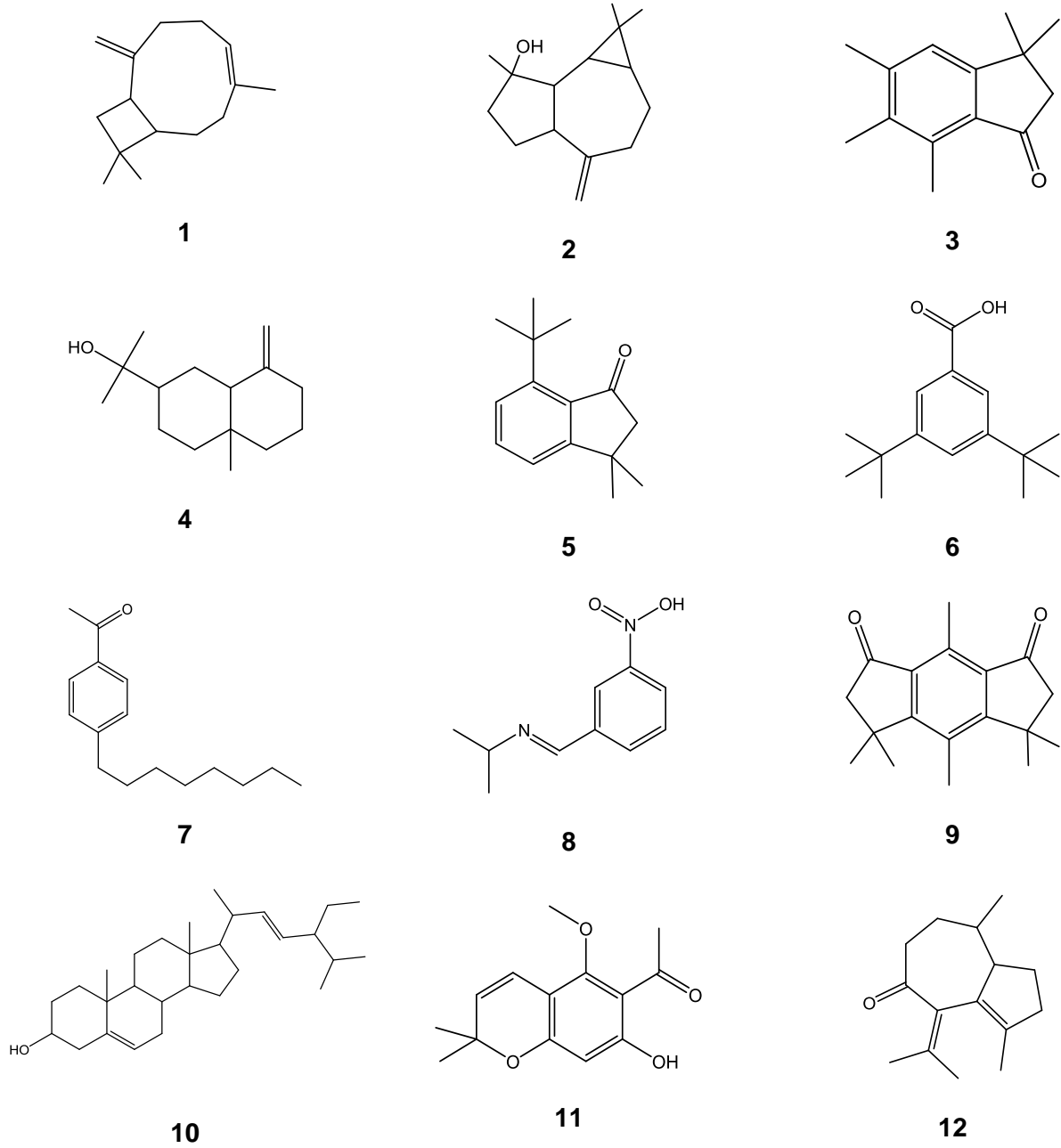


Figura 12 Compuestos presentes en el extracto acetónico de *A. aschborniana*

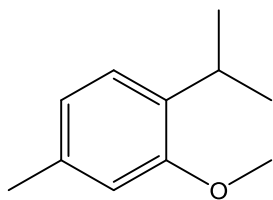
Para el extracto hexánico de *A. glabrata* se identificaron quince compuestos como mayoritarios, identificándose a los compuestos **1** (Cariofileno, 1.60 %), **2**

(Espatulenol, 3.24 %), **4** (β -Eudesmol, 8.25 %), **5** (7-(1,1-dimetil-etil)-2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-inden-1-ona, 5.80 %), **6** (Ácido benzoico 3,5-diter-butilo, 15.23 %), **7** (*p*-octil acetofenona, 1.19 %), **8** (N-[(3-nitrofenil)metilen]-2-propanamina, 1.54 %), **9** (2,3,5,6-tetrahidro-3,3,4,5,5,8-hexametil-S-indaceno-1,7-diona, 1.55 %), y el **10** (Estigmasta-5,22-dien-3-ol, 2.12 %). El resto de los compuestos presentes en el extracto acetónico de *A. aschemborniana* se muestran en la tabla 23.

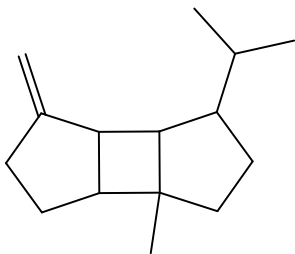
Tabla 23 Contenido químico del extracto hexánico de *A. glabrata* por GC-MS

Compuesto (% de abundancia, identificación)	t_r (min)	[M] ⁺	Fragmentación MS
Metil éter de timol (0.96 %, 13)	10.77	164	149, 134, 119, 105, 91, 77, 65, 51, 27
β -Burbureno (0.39 %, 14)	12.96	204	161, 147, 133, 123, 119, 105, 91, 81, 67, 53, 41
β -Cubebeno (1.53 %, 15)	14.22	204	189, 161, 147, 133, 119, 105, 91, 79, 67, 55, 41
Oxido Cariofileno (0.95 %, 16)	15.50	218	205, 187, 149, 135, 121, 109, 93, 79, 65, 51, 39, 27
Acetato de carvacrol (1.66 %, 17)	17.12	220	177, 163, 120, 107, 92, 77, 63
Acetato de flaviolin (0.45 %, 18)	19.43	248	233, 219, 205, 191, 179, 163, 147, 135, 106, 95, 77, 69, 51
5,6-Dimetoxi-2,4-dimetil-8-quinolina amina (0.38 %, 19)	19.74	232	217, 189, 177, 147, 133, 119, 104, 84, 43
[5a, 17Z] Pregn-17(20)-en-16-ona (3.28 %, 20)	22.63	300	285, 257, 203, 177, 161, 133, 105, 83, 43
Isologifolen-9-ona (1.68 %, 21)	22.65	218	203, 185, 175, 162, 147, 133, 119, 105, 91, 77, 69, 43
Ciclo tetracosano (1.25 %, 22)	27.82	336	308, 292, 280, 266, 250, 238, 224, 210, 196, 181, 167, 153, 139, 125, 111, 83, 69, 43
β -sitosterol (0.40 %, 23)	37.08	414	396, 381, 369, 329, 303, 271, 255, 213, 199, 173, 145, 107, 81, 69

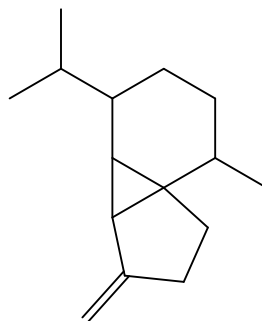
t_r = tiempo de retención, [M]⁺ masa del ion molecular



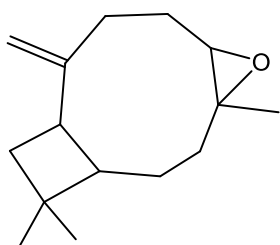
13



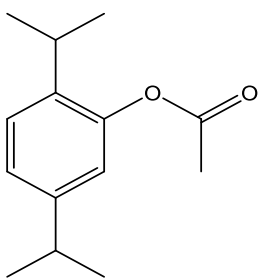
14



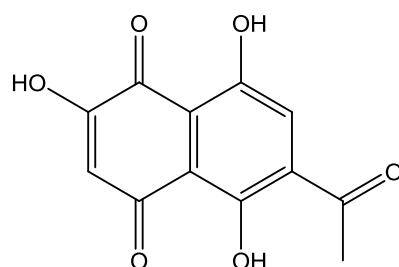
15



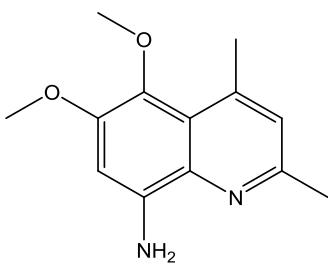
16



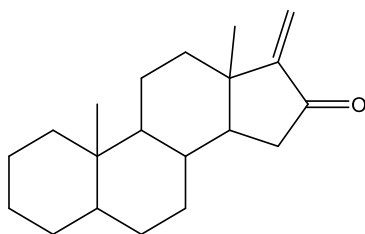
17



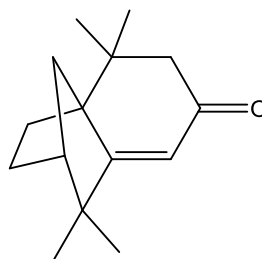
18



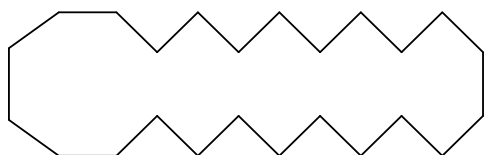
19



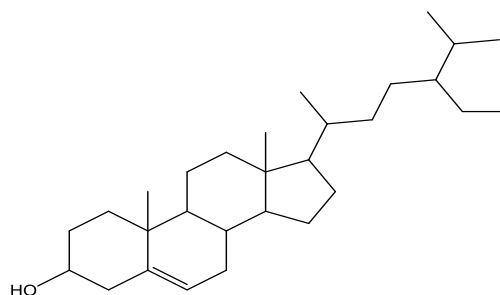
20



21



22



23

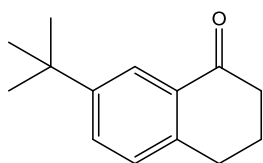
Figura 13 Compuestos presentes en el extracto hexánico de *A. glabrata*.

Para el extracto acetónico de *A. glabrata* se identificaron quince componentes a través de GC-MS de los cuales siete han sido previamente reportados en el extracto acetónico de *A. aschemborniana*: **4** (β -Eudesmol, 14.04 %), **5** (7-(1,1-dimetil-etil)-2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-inden-1-ona, 11.25 %), **6** (Ácido benzoico 3,5-diter-butilo, 3.46 %), **7** (*p*-octil acetofenona, 18.65 %), **9** (2,3,5,6-tetrahidro-3,3,4,5,5,8-hexametil-S-indaceno-1,7-diona, 1.46 %), **10** (Estigmastan-5,22-dien-3-ol, 4.94 %) y **12** (2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metil-etilden)-(1H)-azulenona, 1.94 %). De los quince compuestos cuatro resultaron ser los mayoritarios (tabla 24).

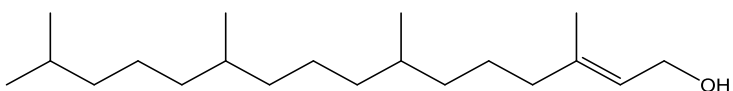
Tabla 24 Contenido químico del extracto acetónico de *A. glabrata* por GC-MS

Compuesto (% de abundancia, identificación)	t_r (min)	[M] ⁺	Fragmentación MS
7-Terbutil-1-tetralona (5.22 %, 24)	16.22	202	187, 171, 159, 141, 131, 115, 108, 101, 91, 77, 67, 58, 43
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol) (4.57 %, 25)	18.10	278	193, 175, 137, 123, 109, 95, 82, 67, 57, 43.
Metil éster del ácido hexadecanoico (1.72 %, 26)	18.98	270	239, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 187, 74, 43
Metil éster del ácido 9,12-octadecadienoico (1.40 %, 27)	20.62	294	263, 237, 220, 205, 192, 178, 164, 150, 133, 123, 109, 95, 67, 41
2,3-dietil, 4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-decahidrobenzo ciclo dodeceno (23.52 %, 28)	21.84	272	257, 229, 217, 201, 187, 173, 161, 145, 133, 115, 105, 91, 77, 43
2,3,4,4a,10,10a-hexahidro-6-hidroxi-1,1,4a-trimetil-7-(1-metil-etil)-(4ad-trans)-9(1H) fenantrenona (4.34 %, 29)	22.53	300	285, 272, 257, 216, 203, 187, 177, 161, 145, 128, 115, 91, 77
4α-acetoxi-3α-angeloiloxi-11-hidroxi-6,7-dehidroeudesman-8-ona (3.56 %, 30)	24.83	348	330, 315, 302, 287, 265, 248, 233, 217, 191, 163, 147, 131, 119, 105, 83, 55

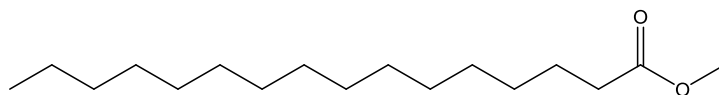
t_r = tiempo de retención, [M⁺] masa del ion molecular



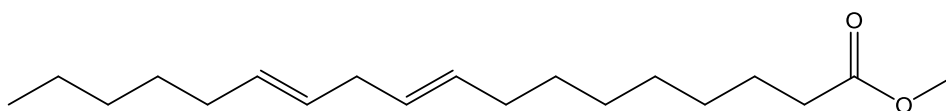
24



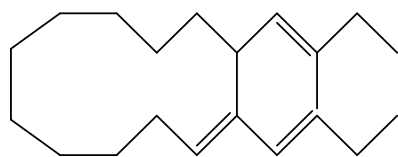
25



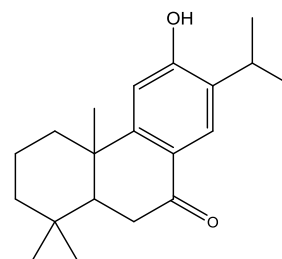
26



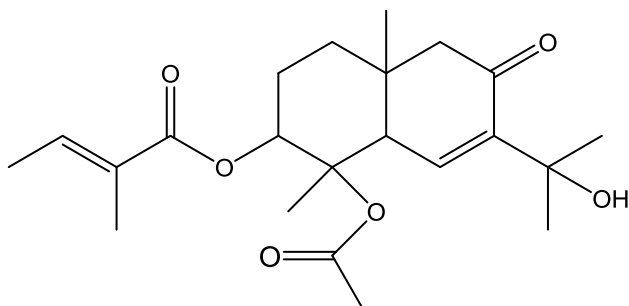
27



28



29



30

Figura 14 Compuestos mayoritarios presentes en el extracto acetónico de *A. glabrata*.

En el extracto hexánico de *A. pazcuarensis* se identificaron un total de 22 componentes, algunos de los cuales ya han sido previamente identificados, los restantes se muestran en la tabla 25. Los compuestos identificados fueron: **2** (Espatuleno, 0.33 %), **4** (β -Eudesmol, 10.30 %), **5** (7-(1,1-dimetil-etil)-2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-inden-1-ona, 6.62 %), **6** (Ácido benzoico 3,5-diter-butilo, 7.58 %), **7** (*p*-octil acetofenona, 2.25 %), **10** (Estigmasta-5,22-dien-3-ol, 1.88%), **11** ((7-hidroxi-5-metoxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-il)-etanona-1, 2.50 %), **13** (Metil éter de timol, 0.33 %), **16** (Óxido de cariofileno, 1.62 %), **19** (5,6-Dimetoxi-2,4-dimetil-8-quinolina amina, 0.91 %), **20** (Isolongifolen-9-ona, 1.94 %), **25** (Fitol, 0.78 %), **26** (Metil éster del ácido hexadecanoico, 1.75 %), **27** (Metil éster del ácido 9,12-octadecadienoico, 1.21 %), **30** (4 α -acetoxi-3 α -angeloiloxi-11-hidroxi-6,7-dehidroeuodeman-8-ona, 2.44 %).

Tabla 25 Contenido químico del extracto hexánico de *A. pazcuarensis* por GC-MS

Compuesto (% de abundancia, identificación)	t _r (min)	[M] ⁺	Fragmentación MS
Isocariofileno (0.58 %, 31)	13.43	204	189, 175, 161, 147, 133, 120, 105, 93, 79, 69, 55, 41
γ -Eduesmol (1.16 %, 32)	16.03	222	204, 191, 176, 161, 133, 119, 105, 91, 81, 59, 43
1-(5,6,7,8-tetrahydro-2,8,8-trimetil-4H-cyclohepta[b]furan-5-il etanona (1.57 %, 33)	17.11	220	205, 163, 145, 128, 120, 107, 92, 77, 43
2,3,5,6-tetrahydro-3,3,4,5,5,8-hexamethyl-S-Indacene-1,7-diona (2.52 %, 34)	20.43	270	255, 227, 212, 197, 171, 153, 128, 105, 77, 43
Metil éster del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (0.99 %, 35)	20.70	292	261, 236, 207, 191, 173, 149, 135, 121, 108, 93, 79, 67, 55
Oximetozolina (13.64 %, 36)	30.86	260	217, 187, 173, 159, 128, 115, 91, 69, 43

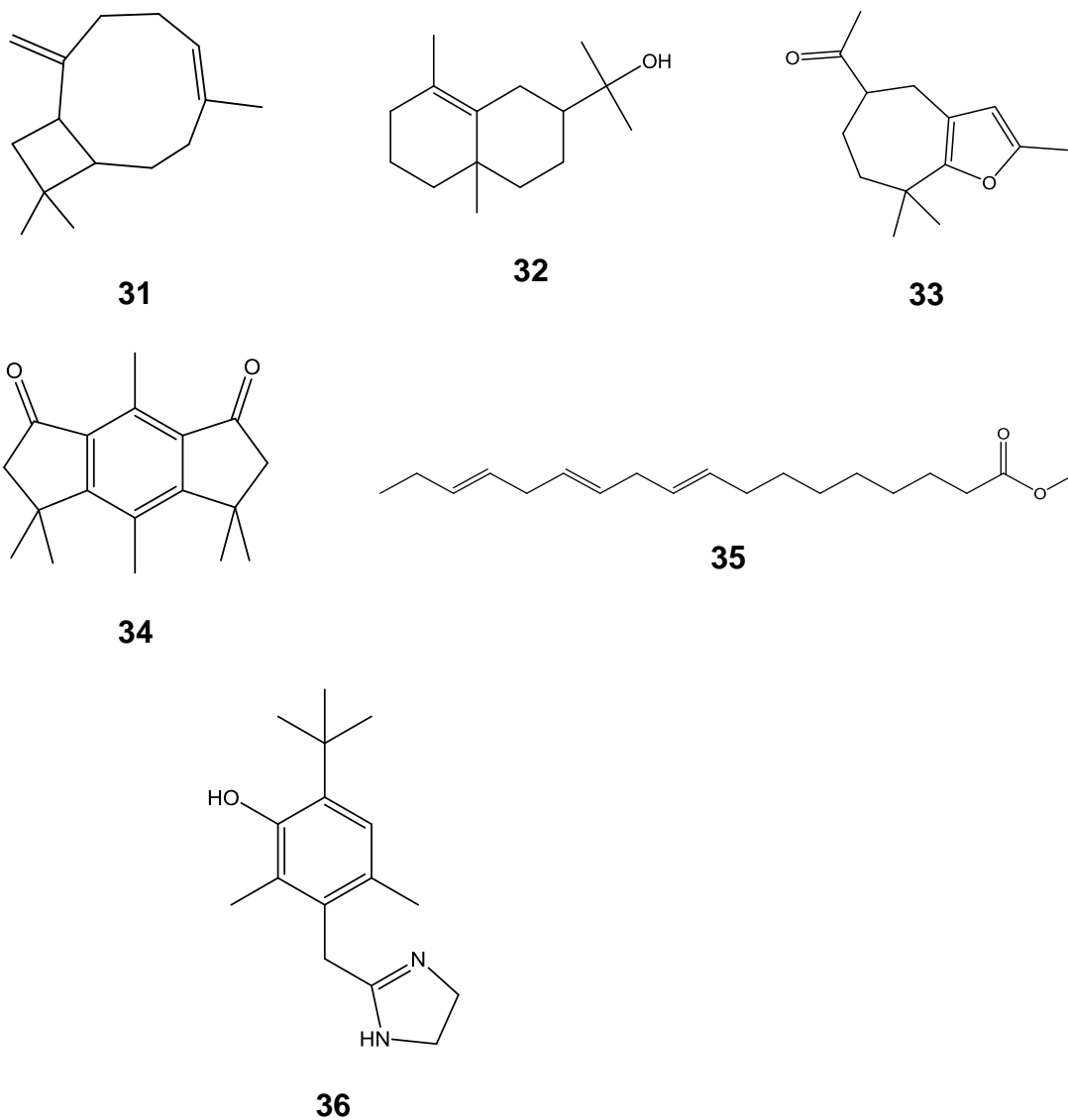


Figura 15 Compuestos presentes en el extracto acetónico de *A. pazcuarensis*.

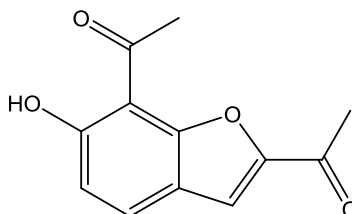
El análisis de GC-MS del extracto acetónico de *A. pazcuarensis* permitió identificar a 10 compuestos de los cuales sólo uno marco la diferencia de este extracto con los previamente descritos, el compuesto se describe en la tabla 26. Los nueve compuesto restantes coinciden con los previamente aquí reportados para las otras dos especies de *Ageratina*, estos compuestos fueron: **4** (β -

Eudesmol, 16.26 %), **5** (7-(1,1-dimetil-etil)-2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-inden-1-ona, 13.62 %), **7** (*p*-octil acetofenona, 3.81%), **10** (Estigmasta-5,22-dien-3-ol, 7.80 %), **23** (7-Terbutil-1-tetralona, 6.79 %), **25** (Fitol, 13.00 %), **28** (2,3-dietil, 4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-decahidrobenzo ciclo dodeceno, 29.84 %) y **29** (2,3,4,4a,10,10a-hexahidro-6-hidroxi-1,1,4a-trimetil-7-(1-metiletil-(4ad-trans)-9(1H)fenantrenona, 3.90 %).

Tabla 26 Contenido químico del extracto acetónico de *A. pazcuarensis* por GC-MS

Compuesto (% de abundancia, identificación*)	t _r (min)	[M] ⁺	Fragmentación MS
2,7-Diacetyl-6-hidroxibenzofurano (4.17 %, 37)	17.47	218	203, 185, 145, 77, 43.

tr = tiempo de retención, [M⁺] masa del ion molecular, *estructura química en la figura 19.



37

Figura 16 Estructura del 2,7-Diacetil-6-hidroxibenzofurano

De lo anterior en la tabla 27 se realizó un resumen de los compuestos identificados para cada estructura de las diferentes especies de *Ageratina*.

Tabla 27 Compuestos identificados en los diferentes extractos analizados

Compuestos	Porcentaje	A.	A. glabrata		A.	
		<i>aschemborniana</i>	H	A	H	A
Cariofileno	0.43	✓	✓			
Espatuleno	0.52	✓	✓			
3,3,5,6,7-pentametil, 1-indonona	4.16	***				
β-Eudesmol	3.81	✓	✓	✓		
7-(1,1-dimetil-etil)-2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-inden-1-ona	11.8	✓	✓	✓		
3,5-diter-butilo del ácido benzoico	13.06	✓	✓	✓		
<i>p</i> -octil acetofenona	4.08	✓	✓	✓	✓	✓
N-[(3-nitrofenil) metil]-2-propanamina	4.08	✓	✓			
2,3,5,6-tetrahidro-3,3,4,5,5,8-hexametil-S-indaceno-1,7-diona	5.32	✓	✓	✓		
NI	19.48	***				
Estigmastan-5,22-dien-3-ol	1.59	✓	✓		✓	✓
(7-hidroxy-5-methoxy-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-il)-etanona-1	1.4	✓			✓	
3,8-dimetil-4-(1-metil-etilideno) (8S-cis)-2,4,6,7,8,8a-hexahidro 5(1H)-azulenona	4.47	✓		✓		
Metil éter de timol	0.96		✓		✓	
β-Burbureno	0.39		***			
β-Cubebeno	1.53		***			
Óxido Cariofileno	0.95		✓		✓	
Acetato de carvacrol	1.66		***			
Acetato de flaviolin	0.45		***			
5,6-Dimetoxi-2,4-dimetil-8-quinolina amina	0.38		✓		✓	
[5a, 17Z] Pregn-17(20)-en-16-ona	3.28		✓		✓	
Isologifolen-9-ona	1.68		***			

Continuación

Compuestos	Porcentaje	A.	A. glabrata		A.	
		aschemborniana			pazcuarensis	
		A				
Ciclo tetracosano	1.25		***			✓
β-sitosterol	0.4		✓			✓
7-Terbutil-1-tetralona	5.22			***		
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol)	4.57			✓	✓	✓
Metil éster del ácido hexadecanoico	1.72			✓	✓	
Metil éster del ácido 9,12-octadecadienoico	1.4			✓	✓	
2,3-dietil, 4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-decahidrobenzo ciclo dodeceno	23.52			✓		✓
2,3,4,4a,10,10a-hexahidro-6-hidroxi-1,1,4a-trimetil-7-(1-metil etil-, (4ad-trans)-9(1H) fenantrenona	4.34			✓		✓
4a-acetoxi-3a-angeloiloxi-11-hidroxi-6,7-dehidroeudesman-8-ona	3.56			✓		✓
Isocariofileno	0.58				***	
γ-Edusesmol	1.16				***	
1-(5,6,7,8-tetrahydro-2,8,8-trimetil-4H-cyclohepta[b]furan-5-il etanona	1.57				***	
2,3,5,6-tetrahydro-3,3,4,5,5,8-hexametil-S-Indacene-1,7-diona	2.52				***	
Metil éster del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	0.99				***	
Oximetozolina	13.64				***	
2,7-Diacetil-6-hidroxibenzofurano	4.17					***

A=Acetona, H=Hexano

De los compuestos identificados en este trabajo, los marcados (✓) son los que se encuentran presentes en dos o mas extractos de las diferentes especies

evaluadas, mientras que los señalados (***) , se refieren a los compuestos identificados solo en un extracto. Se observa que el p-octil acetofenona es el compuesto presente en todos los extractos, sin embargo los extractos hexánicos de *A. glabrata* y de *A. pazcuarensis* tienen compuestos sólo presentes en sus extracto.

A. glabrata posee compuestos sesquiterpénicos y monoterpénico, los cuales pueden estar otorgándole el efecto antimicrobiano, ya que este fue el extracto con mayor actividad (Ciclo tetracosano, 7-terbutil-1-tetralona, β -burbureno, β -cubebeno, acetato de carvacrol, acetato de flaviolin). Mientras que *A. pazcuarensis* presentó compuestos acetofenoícos (Isocariofileno, γ -Edusesmol, 1-(5,6,7,8-tetrahidro-2,8,8-trimetil-4H-ciclohepta[b]furan-5-il etanona, 2,3,5,6-tetrahidro-3,3,4,5,5,8-hexametil-S-indacene-1,7-diona, metil éster del ácido 9,12,15-octadecatrienoico, oximetozolina y 2,7-diacetil-6-hidroxibenzofurano, los cuales pueden ser los responsables de su alta actividad antiinflamatoria.

A. aschenborniana presentó un compuesto mayoritario, pero no fue posible identificarlo, y puede ser el que le confiera mayor afinidad por las levaduras, en vista de que los otros extractos no lo tienen.

A. aschenborniana y *A. pazcuarensis* son especies endémicas del estado de Morelos. *A. glabrata* se encuentra presente en la zona centro de México. *A. aschenborniana* presenta sinonimia de especies con *A. pichichensis*, *A. adenophora* y *A. altissima*, siendo la especie medicinal con mayores antecedentes de estudios químicos y biológicos (Monroy y Castillo, 2010). Con estos

antecedentes es posible identificar los compuestos reportados para las diferentes especies de *Ageratina* previamente estudiadas y observar su coincidencia con los compuestos aquí determinados, el β -Eudesmol (**4**). Para *A. aschenborniana*; y el β -sitosterol (**23**) para *A. glabrata*, estos fueron previamente reportados para la sinonimia *A. pichinchensis* por Aguilar y colaboradores (2009).

Por otro lado, se ha reportado para *A. glabrata* la presencia de compuestos terpénicos de estructura base timol como el 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6 hidroxil isobutirato de timol (Bustos *et al*, 2016), aunque no existe coincidencia química con el aquí determinado metil éter timol (**13**).

A. aschenborniana, es una de las especies más estudiadas de este género, en el presente estudio se pudo corroborar su actividad antifúngica con CIM bajas (4-32 $\mu\text{g/mL}$) y antimicrobiana (Aguilar *et al.*, 2010; Ríos y Aguilar, 2003), también tuvo efecto antiinflamatorio (80.36% de inhibición) lo cual es importante, ya que es un proceso que surge como consecuencia de una infección, sin embargo, no presentó relevante actividad antioxidante. Los compuestos identificados, aunque coinciden con las otras especies, son muy generales, por ello sería importante continuar su estudio como antifúngico.

A. glabrata presentó actividad antimicrobiana contra la mayoría de los microorganismos evaluados (excepto *C. glabrata*), por lo que se podría estudiar más esta actividad, además, también presentó actividad antiinflamatoria, no así antioxidante, sin embargo, es la especie en la que se logró identificar más compuestos que no coinciden en las otras especies (β -burbureno, β -cubebeno,

acetato de carvacrol, acetato de flaviolin) y esto puede permitir aislar moléculas con posibles efectos antimicrobianos

Este es el primer trabajo que reporta la actividad biológica y el contenido químico para *A. pazcuarensis*, ya que la literatura no exhibe estudios anteriores, por lo que este estudio representa una aportación y una nueva área de estudio. Se muestra la actividad antiinflamatoria, así como la presencia de nuevos compuestos identificados, siendo estos posiblemente los que otorgan su actividad antiinflamatoria, por lo que se requiere más estudios encaminado a realizar el aislamiento de estos compuestos.

9. CONCLUSIONES

1. Las tres especies vegetales del género *Ageratina* en los diferentes extractos obtenidos presentaron actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y/o antioxidante.
2. El extracto hexánico de *A. glabrata* fue el mas activo contra la mayoría de los microorganismos evaluados con una CMI de 32-250 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo todos los extractos de *A. aschemborniana* mostraron actividad contra las levaduras evaluadas con una CMI de 4-32 $\mu\text{g/mL}$. *A. pazcuarensis* no presentó actividad contra los microorganismos a las concentraciones evaluadas.
3. Los extractos orgánicos de las tres especies presentaron efecto antiinflamatorio a la concentración probada (0.1 mg/oreja.) comparable a la mostrada por el control positivo usado a la misma concentración (indometacina, 91.80% de inhibición). El extracto metanólico de *A. aschemborniana* presentó inhibición de 80.36%, el extracto acetónico de *A. glabrata* de 87.24% y el extracto acetónico *A. pazcuarensis* de 89.63 % .
4. En el caso de la actividad antioxidante, sólo el extracto activo *A. aschemborniana* ($\text{CL}_{50}=6.51\mu\text{g/mL}$) fué activo por el método DPPH.
5. Las plantas conocida como axihuitl poseen diferentes propiedades en la medicina tradicional. En el presente estudio se corroboró el uso etnomédico que tienen estas especies en el estado de Morelos, por una parte el uso como antimicrobiano en el lavado de heridas, así como antiinflamatorio, ya sea para tratar una úlcera gástrica o artritis reumatoide. Estas actividades se relacionan con una acción antioxidante, sin embargo en este punto, se necesita mas especificidad en cuanto a los compuestos, para concluir que tan activos pueden ser.

10. PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios dirigidos para aislar, identificar y elucidar la o las molécula(s) presente en el extracto responsable de la actividad antimicrobiana y determinar su mecanismo de acción, con la finalidad de generar nuevas alternativas para la obtención de antimicrobianos de amplio espectro a partir de una fuente de origen natural.
2. Determinar la eficacia y/o toxicidad de los compuestos activos en modelos *in vivo* con el fin de determinar la estabilidad del extracto obtenido frente a agentes físicos y químicos que puedan interferir en la actividad antimicrobiana reportada en el presente trabajo.
3. Debido a que los extractos activos presentan bajo rendimiento, es importante profundizar los estudios sobre estos, ya que su aprovechamiento depende las concentraciones de los metabolitos secundarios presentes en un extracto.
4. En el caso del extracto hexánico de *A. glabrata*, evaluarlo contra microorganismos de interés en salud pública (*A. baumannii*, *E. faecium*, *H. pylori*, *Salmonellae*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *Shigella* spp.) dado el potencial antibacteriano descrito en este trabajo. De la misma manera el extracto hexánico de *A. aschemborniana* presenta acción contra levaduras (*Malassezia* ssp, *Cryptococcus* ssp).
5. Realizar un análisis espectroscópico y cromatográfico para caracterizar el perfil de compuestos de los extractos y las fracciones que resulten activas.

6. Aislar y purificar el o los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria obtenida por los extractos evaluados en el presente trabajo, y poder determinar su mecanismos de acción, para que permitan evaluar su actividad ante otras patologías que implican un proceso inflamatorio (hipertensión arterial , citotóxico, analgésico, etc.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AB, Lichtman AH. (2009). «Ch.2 Innate Immunity». Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system (3rd ed.). Saunders (Elsevier);(6)130-145.
- Aguilar GB, Navarro V, Rivera LI, Ríos MY. (2009). Active compounds against *Tinea pedis* dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. Nat. Prod. Res; 23:16.
- Arenas E. (2005). Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un laboratorio de Micología. Rev. Ciencia y Trabajo.; 15(1):52-67.
- Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. Food Res. Inter; 44: 391–396.
- Baker C. (2009). Red book: Atlas de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Editorial Medica Panamericana. 1era. Edición.84-159
- Benzie IFF y Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power” The FRAP assay, Analytical Bioch. 239, 70–76.
- Bertram B y Bartsch H.(2002). Cancer prevention with green tea: reality and wishful thinking. Wien Med Wochenschr; 152(5-6):153-158.0
- Bidart T.(2004) Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales. Rev Chilena Infectol.;22:40-45.
- Boege E. (2008). El patrimonio biocultural de los pueblos indígenas de México. INAH, México, D.F.
- Buhimschi I, Weiner CP. (2001). Oxygen free radicals and disorders of pregnancy. Fetal Maternal Med Rev; 12:273-298.
- Bustos BC, Sánchez CM, Esquivel B, Calderón JS, Calzada F, Yépez ML., Joseph NP, Cuevas G, Quijano L. (2015). ent-Kaurene Glycosides from *Ageratina cylindrica*. J Nat Prod.; 78(11):2580-2587.
- Bustos BC, Sánchez CM, Esquivel B, Calderón JS, Calzada F, Yépez ML, Hernández BA, Joseph NP, Quijano L. (2014). "Structure, absolute configuration, and antidiarrheal activity of a thymol derivative from *Ageratina cylíndrica*." J. Nat. Prod, 77, 358-363.

- Bustos BC, Vázquez HVJ, Calzada F, Yépez ML, Calderón JS, Hernández OS, Esquivel B, García HN, Quijano L. (2016). Antidiarrheal Thymol Derivatives from *Ageratina glabrata*. Structure and Absolute Configuration of 10-Benzoyloxy-8,9-epoxy-6-hydroxythymol Isobutyrate. *Molecules*; 21(9), 1132.
- Calvo J y Martínez ML. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 27:44-52.
- Cantón R.(2010) Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enf. Inf. y Microb. Clín.*; 28(6):375–385.
- Carrillo OD. (2009) Actividad antioxidante y antiinflamatoria de las hojas de *Vitex mollis*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Farmacia. Págs. 33-57.
- Castellanos MT, Poveda MA, Rivero SV, Oliver DMM. (2013). Microorganismos patógenos y potencialmente patógenos en secreciones genitales de gestantes a término asociados a complicaciones posnatales. *Scientia et Technica*;15 (4).
- Çelik SE, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*; 8: 1300–1309.
- Chakraborty A, Devi R, Rita S, Sharatchandra K. y Singh T. (2004). Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. *Indian J Pharmacol* ;36: 148 -150.
- Clarkson P y Thompson H.(2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr* ;72 (2): 637S-646S.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.(2002). Approved Standard-Second Edition NCCIS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCIS, Pennsylvania, USA
- Cordell GA, Colvard MD.(2012). Natural products and traditional medicine: Turning on a paradigm. *J Nat Prod* ;75:514–525.
- Cortés GMA, Navarro NMA y Peña RJA. (2011). Medicina Tradicional indígena: efectividad a prueba. *Rev. TUKARI* ;3 (16): 2,4.
- Cragg GM y Newman DJ.(2013) “Natural products: a continuing source of novel drug leads,” *Biomed. & aging Path*; 1: 1-7.
- Cruz SJ. (2007). Más de 100 Plantas Medicinales. Editorial: Obras social de la caja de las canarias. págs. 28-45.

- Darren JB.(2014). Amplified origins of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*; 12:394–395.
- del Palacio AVJ y Alhambra A. (2009). Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol.*; 26 (1):2-7.
- Díaz PS, Gallego GA, López CL, Ferreras GJ, Antón AJ. (2009) Cyclooxygenase-2 (COX-2) and epidermal growth factor (EGF) in oral premalignant epithelial lesions. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* ;31 (3).
- Dong LM, Zhang M, Xu QL, Zhang Q, Luo B, Luo QW, Liu WB, Tan JW. (2017) Two New Thymol Derivatives from the Roots of *Ageratina adenophora*. *Molecules*; 8; 22(4).
- Drago M, López M, Saín T.(2006) Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev Mex. Cs Far*; 37 (4): 58-68.
- Duarte MJ, Espinosa LRF, Sánchez RG, De Santiago .J, Díaz MS, Lee CV. (2009). Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Aspectos fisiopatológicos. *Rev. Asoc. Mex. De Méd.*; 23(4): 225-233.
- Dulger C, Aki C. (2009) Antimicrobial Activity of the Leaves of Endemic *Stachys pseudopinardii* in Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(4): 371-375.
- Fang N y Mabry TJ. (1986) Sesquiterpenes from *Ageratina tomentella*. *Phytochemistry*; 25(11):2684-2686.
- Feijó M, Túnez I, Ruiz A, Tasset I, Muñoz E, Collantes E. (2010). Biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores de actividad en la enfermedad articular inflamatoria crónica. *Reumatol Clin.*; 6(2):91–94.
- Fernández AR, González GME , Fernández GJ y Cepeda FJ.(2005). Fármacos antifúngicos. Situación actual y pautas para su administración. *Clin Transl Oncol.*; 7(9):377-388.
- Fernández PMS, Villaño DA, Troncoso AM, García PMC. (2006) Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *ALAN* ;56 (2):110-122.
- Fernández RF, López HJ, Ponce ML. (2003). Resistencia antibacteriana. *Rev. Cub.Med. Milit.*:32(1);44-48.
- Ferraro MJ. (2001). National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement; 21 (1).

- Fleischer NL, Valencia DRA, Alazraqui M, Spinelli H. (2008). Social patterning of chronic disease risk factors in a Latin American city. *J Urban Health* 85(6):923-937.
- Gamboa FJL (2003). Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica. *UNIV DIAG* ;3(1):20-24.
- García AGJE, Ramírez HBC, Robles AG, Zañudo HJ, Salcedo RAL (2012) Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara Desacatos. *Revista de Ciencias Sociales*.
- García QM y Díaz PG. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos.
- García SCA, Sánchez GA y Villaseñor JL.(2014) La familia Asteraceae en el Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Act. Bot. Mex.* 106;97-116.
- Gil del Valle L. (2011). Oxidative stress in aging: theoretico outcomes and clinical. *Biomedicine & Aging Pathology*;1 (1):1-7
- Gómez EHA, Gonzalez RKN, Medina DJ. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Bol. Lat. y del Caribe de Plant. Med. y Arom.*10 (3): 182-217
- González GA, Bermejo BJ, Yañes CA, Díaz GE, Rodríguez EM. (1989). Chromenes and benzofurans from *Ageratina glechonophylla*. *Phytochemistry*,28 (9);2520.
- González MAC, Ospina GLF, Rincón VJ. (2011). Actividad Antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Caleaprunifolia*, *Curatella americana* y *Physalis peruviana* en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por Carragenina y Artritis inducida por colágeno. *Biosalud* ;10 (1): 9 - 18.
- Gregorí VBS (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm* 2005; 39 (2).
- Gutiérrez MA. (2003). Oxidantes en el humo del cigarro y enfermedades cardiopulmonares. *Rev Cubana Med*; 42(5).
- Gutiérrez MC y Droguet M. (2002) La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTER (U.P.C.)*. Universidad Politécnica de Catalunya, 122: 35-41.

- Gutiérrez, J. P., García-Saisó, S., Dolci, G. F., & Ávila, M. H. (2014). Effective access to health care in Mexico. *BMC health services research*, 14(1), 186.
- Han J, Ulevitch RJ.(2005) Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* ;6(12):1198-1205
- Hardman JG, Limbird LE y A. Goodman Gilman. (2008): Fármacos antimicóticos. En Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial McGraw-Hill, México, 10 (2) 49: 1311-1328
- Heinrich M, Liu HW, Mander L. (2010) Ethnopharmacology and drug Discovery, *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier; 351–381.
- Hernández AJM. (2014). Diterpenos de *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y evaluación del efecto antiinflamatorio y citotóxico. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de ciencias. Tesis de Doctorado. Págs. 21-65
- Hernández CC, Aguilera AMG, Castro EG. (2011) Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol.*; 31(4):137-151.
- Hernández GD, Wood CD, Castro OS, Covarrubias L.(2010) Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic Biol Med.*; 49(7):1147-1151.
- Hetter GP. (2000). An examination of the Phenol Croton Oil Peel: Part I. Dissecting the formula. *Plastic Reconstr Surg* 105: 227 - 239.
- Hirst J, King MS. & Pryde KR.(2008) The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans*; 36, 976-980.
- Holland TL, Woods CW, Joyce M. (2009) Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. *Infect Dis Clin North Am*;23(4):757-90.
- INEGI. <http://www.inegi.org.mx/>. Consultado en Agosto del 2016
- Información Epidemiológica de Morbilidad. (2015). Secretaria de Salud Pública.
- Ito M, Yahara T, King MR, Oshita KS, Yokoyama J, Crawford JD. (2000). Molecular Phylogeny of *Eupatorieae* (Asteraceae) Estimated from cpDNA RFLP and its Implication for the Polyploid Origin Hypothesis of the Tribe. *Journal of Plant Research*, Volume 113, Issue 1, pp 91-96.
- Katzung BG. (2007). «Chapter 46. Sulfonamides, Trimethoprim, & Quinolone». *Basic y Clinical Pharmacology* (9 edición). McGraw-Hill.
- Kauffman CA.(2016). Cryptococcosis. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman-Cecil Medicine*. 25th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 336.

- Kokotos F, Adam HM. Vulvovaginitis. *Pediatr Rev.* 2006; 27;116-117.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. y Aster JC. (2010). *Robbins y Cotran - Patología estructural y funcional* Ed. Elsevier, 8ª ed.
- Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos I, Solórzano F, Miranda G. (2009). «Capítulo 2: Microbiota Normal». *Infectología Clínica Kumate-Gutiérrez* (17ª edición). México: Méndez Editores pp. 13-21.
- Lacy C, Armstrong L, Goldman M y Lance L.(2013) *Drug Information Handbook* 22 edición. Edición Internacional. American Pharmaceutical Association. Lexi Comp. USA.
- Lebeque PY., Morris QH y Celás VN. (2006). Infecciones nosocomiales: Incidencia de la *Pseudomonas aureginosa*. *Rev. Cubana de Medicina.* Vol.45: n.1.
- Lee GM. y Artaza O. (2013). Elementos esenciales en la cobertura universal. *Cobertura Universal de Salud*; (1): 21-23.
- León NS, Félix VL, Chávez FJ, Quispe FP. (2012). Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de los tallos de *Ageratina sternbergiana* (DC.) R.M. King & H. Rob ``Zun Zun``. *Revista ECIPERU*; 8 (2): 245-252.
- Lin QX, Zhang M, Yu ZZ, Xue LW, Hao WF, Feng WH, Wen TJ. (2014). Two new carene-type monoterpenes from aerial parts of *Ageratina adenophora*. *Phytochemistry Letters*, 9:123-126
- Liu B, Gao H.M., Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS (2002) Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.*, (962):318 - 31.
- Lizcano RAJ. y Vergara GJL. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Valeria pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana.:26-28
- López BG.y Ballesteros R. (2003) Efectos de la exposición al ozono en personas con enfermedades cardiovasculares en Mexicali, BC *Rev Fac Med.* ;46(6).
- López GJ y Gutiérrez E.M (2009) América Indígena ante el siglo XXI. *Quaderns* ;25: 187-192.
- López LMT. (2002). Formas de administración más habituales de plantas medicinales. *OFFARM* ;21 (2).

- López MA., Palou M. y Davidson P. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. Antimicrobials in Foods. 3ra. Edición Editorial Grupo Taylor y Francis; (21:659-680).
- MacDonald-Wicks L.K.; Wood L.G, Garg ML. (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: A review. J. Sci. Food Agric.;86, 2046–2056.
- Maldonado SO, Jiménez VEN, Guapillo VMRB., Méndez BE. (2010) Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV,
- Mandell GL, Dolin R, Bennett J (2006). Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica. 6.a Edición ed. Madrid: Elsevier Churchill Livingston.
- Martín RSN, Vázquez FS. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 26(3):160-167.
- Martinez J (2007) "Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Helicarpus terebinthinac* "[Tesis licenciatura] Huacalpan de Leon, Oaxaca. Universidad de la Mixteca.
- Mayer G.(2016). Departamento de ciencias fisiológicas. Clase de: "Fluoroquinolonas, Sulfonamidas, Trimetoprim y Antisépticos Urinarios." Pontificia Universidad Javeriana Bogotá
- Mendoza MA. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Revista de la Facultad de Medicina. 54(001):18-27.
- Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V y Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science. 84: 407-412
- Miranda CE, Espinosa MJ, Centurión HD, Velázquez MJR, Alor C. (2012) Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 11 (4):354-361.
- Miranda LM. (2008). Entrevistas sobre el axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.) en Tepoztlán, Mor., México Tlahui-Medic. No. 25, I
- Monroy OC. y Castillo EP, (2010). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. 3da. ed. Universidad Autónoma de Morelos. pp 405.

- Murray PR. (2013) Manual of Clinical Microbiology 12^a edición. American Society for Microbiology.
- Narayanan M, Cooper B, Weiss H, Clyman R. (2000) Prophylactic indomethacin: factors determining permanent ductus arteriosus closure. J Pediatr; 136: 330
- Navarro NM, Robles ZRE, Garibay EA, & Ruiz BE.(2011). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de β -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. Salud Pública de México, 53(4), 341-344
- Neira FA y Ortega J L.(2006). Tratamiento del dolor en la artritis reumatoide fundamentado en medicina basada en la evidencia. Rev. Soc. Esp. Dolor;13(8):561-566.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. In: Buss AD, Butler MS, editors. RSC Biomolecular Sciences No. 18; Natural Product Chemistry for Drug Discovery. Royal Society of Chemistry; Cambridge, UK: 2010. pp. 3–27.
- OMS 2015. <http://www.who.int/es/>. Consultado el 28 denoviembre dell 2016
- OMS 2017. <http://www.who.int/es/>. Consultado enero del 2017
- Ozgen M, Reese RN, Tulio AX., Miller AR, Scheerens JC. (2006). Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl- 1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. J. Agric. Food Chem. 54:1151-1157.
- Paciel D, Seija V, Prieto J, Vignoli R, Medina J, Savio E. (2011). Enterobacterias productoras de KPC. Rev. Tendencias, 2011
- Pardi G, Cardozo EI. (2002). Algunas Consideraciones sobre *Candida albicans* como agente Etiológico de Candidiasis Bucal. Acta odontológica venezolana; 40(1): 25, 28.
- Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller (2009). «Flora microbiana comensal y patógena en el ser humano». En: Patrick R. Murray. Microbiología Médica 6 Ed (6a edición). España: Elsevier-Mosby. pp. 73–76.
- Pérez CHJ, Robles CA.(2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia Bacteriana. Rev. Méd. 4(3):186-191.

- Pérez MLH, Zurita VIM, Pérez RN, Patiño CN, Calvimonte OR. (2010). Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención. Rev Cient Cienc Méd. 13 (2): 90-93.
- Porras RJ. (2011). Aislamiento e Identificación de Derivados de Timol, Obtenidos De La Planta *Ageratina cylindrica*. Universidad Veracruzana. Facultad De Ciencias Química, Tesis de Licenciatura.
- Puerto NL, Perez RS, Giron MA y Peces BC. (2010). "Papel de la inflamación en la etiopatogenia de la EPOC". *Arch Bronconeumot*, 46(SupplIII),2-7.
- Ringuelet J y Viña S. (2013). Productos Naturales Vegetales. Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN). Primera edición, 2013. La Plata, Buenos Aires, Argentina ;3:4-18
- Ríos GY y Aguilar GAB. (2003). Two new benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity. *Plant. Med.* 69: 967.
- Rippon J.W. (2011). Micología Médica. Hongos y Actinomicetos patógenos. 3ra. edición. Interamericana Mc Graw-Hill, México.
- Rivera OA.(2006). AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. *Rev. Mexi. de Anest.* ;29(1): 36-40
- Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo L. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev cubana Med Milit*; 30(1):15-20.
- Romero CO, Zamilpa A, Tortoriello J. (2015). Pilot study that evaluated the clinical effectiveness and safety of a phytopharmaceutical elaborated with an extract of *Ageratina pichinchensis* in patients with minor recurrent aphthous stomatitis. *J Ethnopharmacol.*; 173:225-230.
- Romero CO., Garduño IAL., Zamilpa A., Tortoriello J. (2012). Exploratory study on the effectiveness of a standardized extract from *Ageratina pichinchensis* in patients with chronic venous leg ulcers. *Planta Med.*;78(4):304-10
- Romero CO., Román RR., Zamilpa A., Jiménez FJE., Rojas BG., Tortoriello J. (2009). Clinical trial to compare the effectiveness of two concentrations of the *Ageratina pichinchensis* extract in the topical treatment of onychomycosis. *Journal of Ethnopharmacology*; 126 (1):74-78.
- Romero CO., Zamilpa A, Cortazar GM., Cortés DA., Ferrer JE., Torres NP., Santamaría AL., Tortoriello J. (2017). Effectiveness of *Ageratina pichinchensis* Extract in Patients with Vulvovaginal Candidiasis. A Randomized, Double-Blind, and Controlled Pilot Study. *Phytother Res.* 2017 Mar 16.

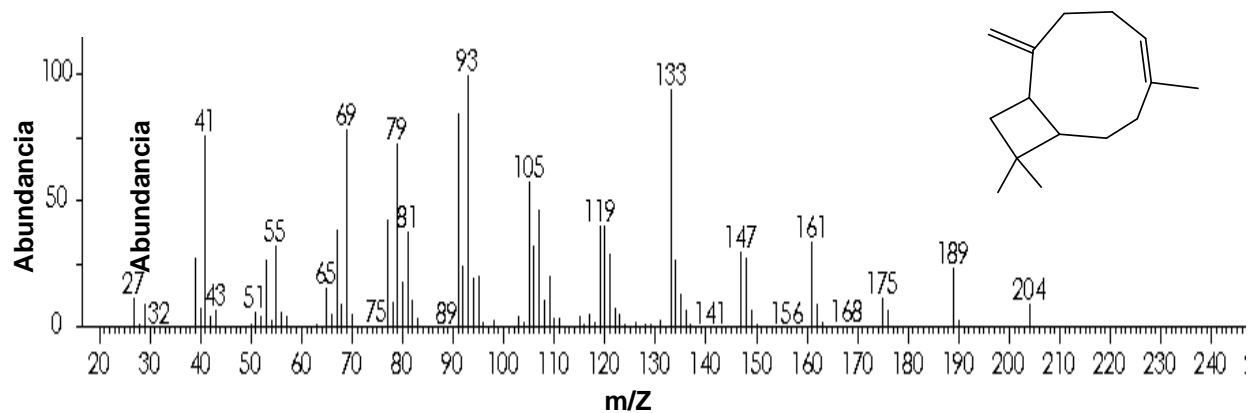
- Romero CO., Zamilpa A., Ferrer J E., Tortoriello J. (2012). Therapeutic effectiveness of *Ageratina pichinchensis* on the treatment of chronic interdigital *Tinea pedis*: a randomized, double-blind clinical trial. *J Altern Complement Med.*;18(6):607-611.
- Romero CO., Zamilpa A., Tortoriello J. (2015). Antinociceptive effect and gastroprotective mechanisms of 3, 5-diprenyl-4-hydroxyacetophenone from *Ageratina pichinchensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 13 (15):225-230.
- Romero CO., Zamilpa AA., Jiménez FE., Tortoriello J. (2013). Pharmacological and chemical study to identify wound-healing active compounds in *Ageratina pichinchensis*. *Planta Med.*;79(8):622-627.
- Rubinson KA.& Rubinson JF. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Prentice Hall.
- Sánchez MC. (2002) Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. TechInt*, 8(3), 121-137.
- Sánchez MME, Rodríguez SJ, Rivero CJF, Rocha GHI, Pineda FJB, Arrieta J. (2013). Antinociceptive effect and gastroprotective mechanisms of 3,5-diprenyl-4-hydroxyacetophenone from *Ageratina pichinchensis*. *Fitoterapia*;87: 11-19.
- Schlaepfer L y Mendoza JA.(2010). "Las Plantas Medicinales en la lucha contra el cancer , relevancia para Mexico." *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41, 18-27.
- Secretaria de Salud Pública anuario 2015. <http://portal.salud.gob.mx/>. Consultado 20/05/2015.
- Silva DG, Stevens RH, MacEdo JMB, Albano RM, Falabella ME V, Fischer RG. (2010). Presence of *Helicobacter pylori* in supragingival dental plaque of individuals with periodontal disease and upper gastric diseases. *Arch Oral Biol.*;55:896-901.
- Silverstein RM, Webster FX, & Kiemle DJ. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds (7ª edición ed.)*. United States of America: Wiley
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. y Crouch SR. (2005) *Fundamentos de química analítica (8ª Ed.)*. México, D. F.: Thomson.
- Surveswaran S, Cai YZ., Corke SH.(2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.*, 102 (2007), pp. 938-995

- Tahir M, Faley B, Pate, G. (2000). Impact of vitamin E and C supplementation on serum adhesion molecules in chronic degenerative aortic stenosis: A randomized controlled trial. *Am Heart J*; 150: 302-306.
- Tapia MJL. (2010). Familia Asteracea. Unidad de recursos naturales. Centro de investigación de Yucatán.
- The Plant List. <http://www.theplantlist.org/>. Consultado en febrero, 2015.
- Torrenegra R, Robles J, Pedrozo J, Pescador B. (1999). A New Diglycoside of Diterpene from *Ageratina vacciniaefolia*. *Molecules* 4:94.
- Torrenegra RG., Robles CJ., Pedrozo PJ. (1995). "Terpenos y flavonoides de *Ageratina fastigiata* (H.B.K.) King & Robinson" *Revista Colombiana de Química* 24.1
- Torres BL., Rojas VJ., Morales MA., Rojas FL. Lucena M., Buitrago A. (2013) Composición química y evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Ageratina jahnii* y *Ageratina pichinchensis* recolectadas en Mérida, Venezuela. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12 (1): 92 - 98
- Torres CM. (2004). Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis – Subdirección Científica. Bogotá D. C.:2-14.
- Van OB, Smets K, Lecoutere DA. (2000). comparison of ibuprofen and indomethacin for closure of patent ductus arteriosus. *N Engl J Med*; 343: 674-81.
- Vera DYP. (2016). Actividad antioxidante y citotóxica de los extractos y fracciones de hojas e inflorescencias de *Ageratina gracilis*. Universidad de ciencias aplicadas y ambientales (U.D.C.A). Facultad de ciencias. Tesis de Licenciatura.
- Vila J, Álvarez MM, Buesa J. y Castillo J. (2009). Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Microbiología Clínica*.;27(7):406-411.
- Villamil CI, Van den ECA., Martínez RC, Rodríguez OL., Rodríguez FM. (2006). *Proteus mirabilis* Community-Acquired Pneumonia. *Med Interna* 23 (3), 146.
- William BW y Culiever ME. (1995). Use of a free radicals method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Techn*;28(1):25-30

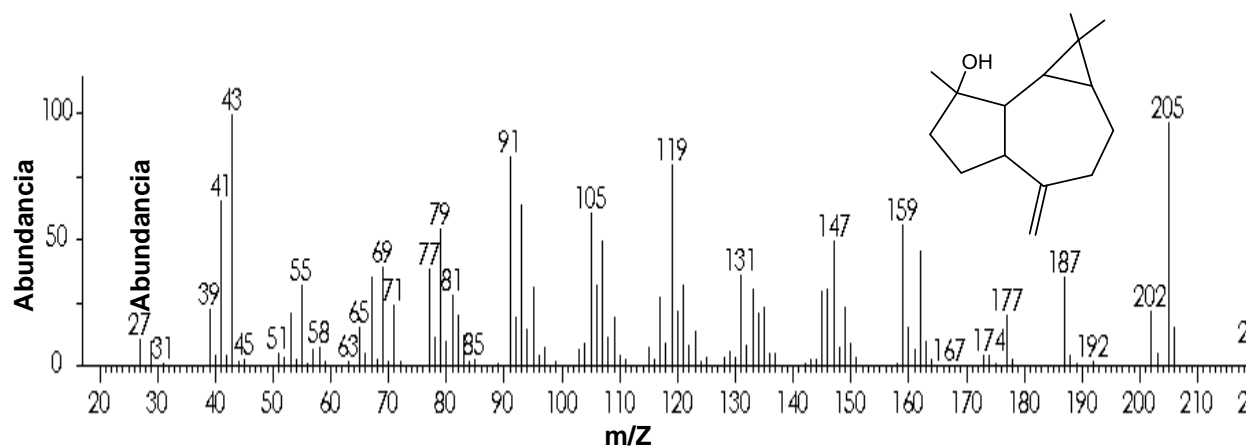
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerzys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. Volume 105, Issue 3, 2007, Pages 940-949
- Yamaguchi Y, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. (2000). Peroxynitrite-generating species: good candidate oxidants in aqueous extract of cigarette smoke. Jpn J Pharmacol; 82(1):78-81.
- Zhang M, Xue LW, Fei ZM, Lin XQ, Hao WF,, Wang J, Lei T, Yu ZZ, Wen TJ.(2013).Bioactive Quinic Acid Derivatives From *Ageratina adenophora*. Molecules 18 (11), 1409-1410.
- Zhong YZ, Wan XL,Gang P, Hui R,Jing W, Qiao LX , Hai HX , Fang HW,JianWT.(2013). Phenolics From Ageratina Adenophora Roots and Their Phytotoxic Effects on *Arabidopsis thaliana* Seed Germination and Seedling Growth. J Agric Food Chem 61 (48), 792-79.

12. ANEXOS

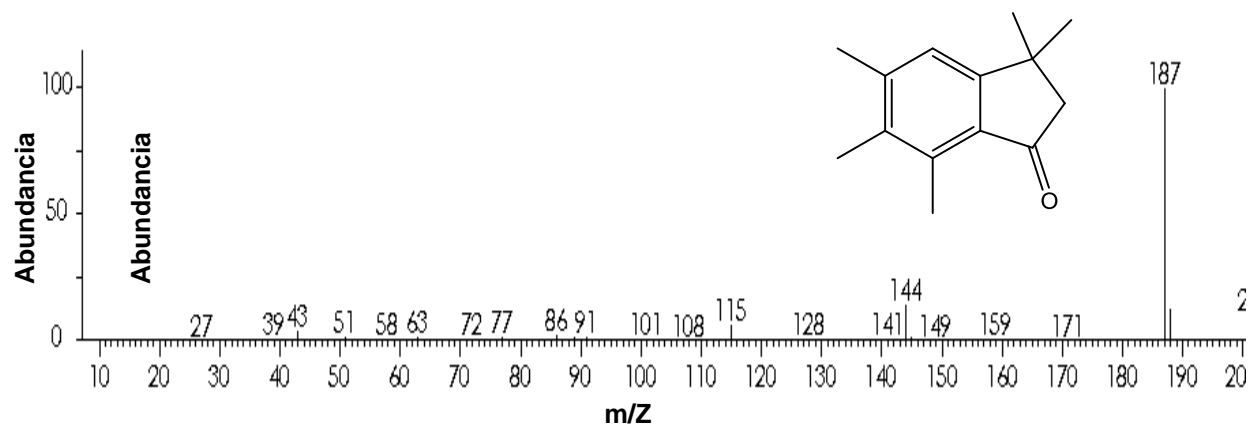
Ageratina aschbornia extracto acetónico



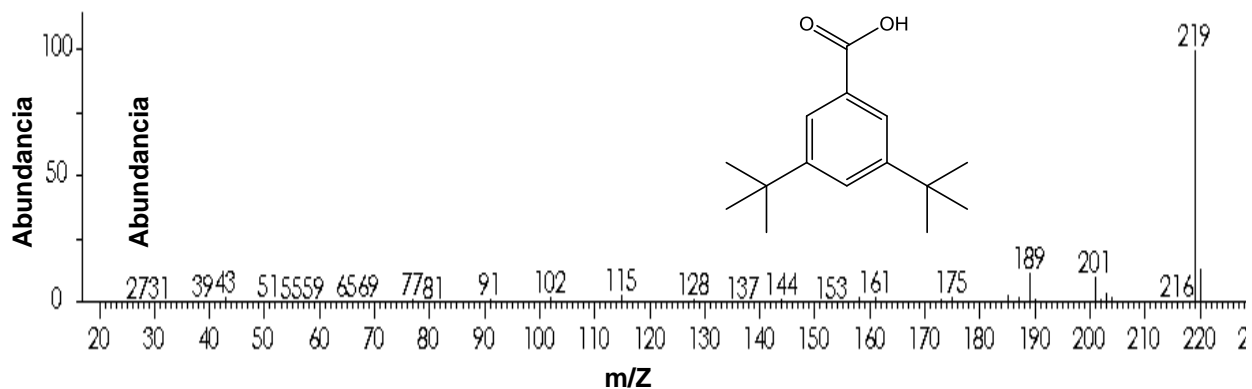
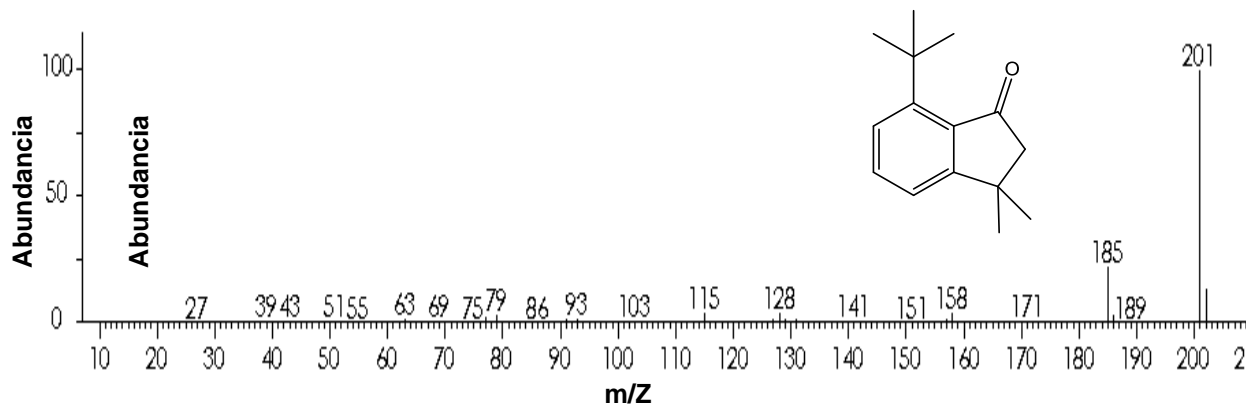
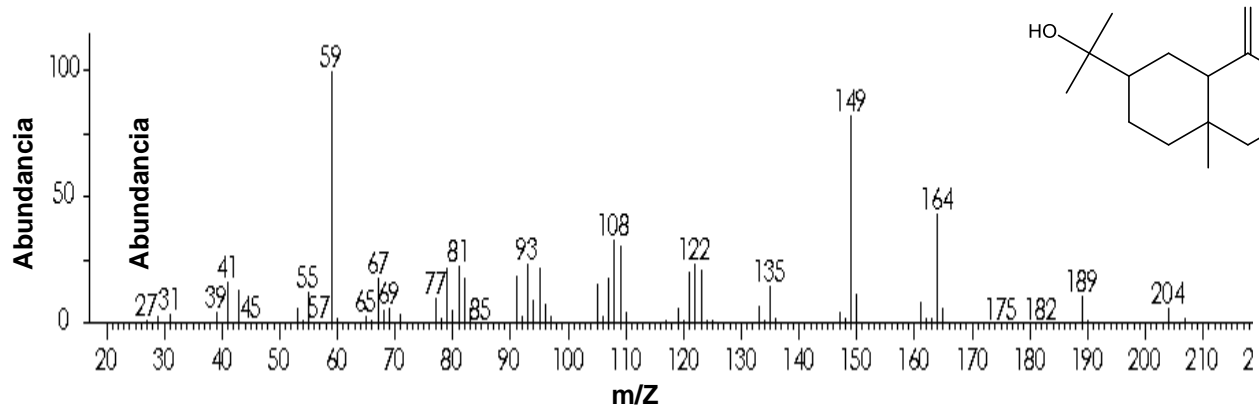
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas de Cariofileno

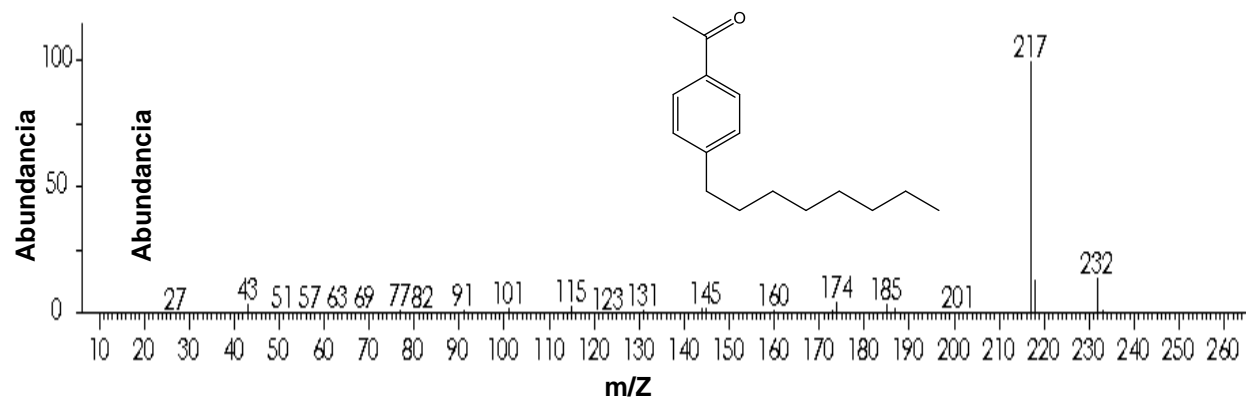


Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas de Espatuleno



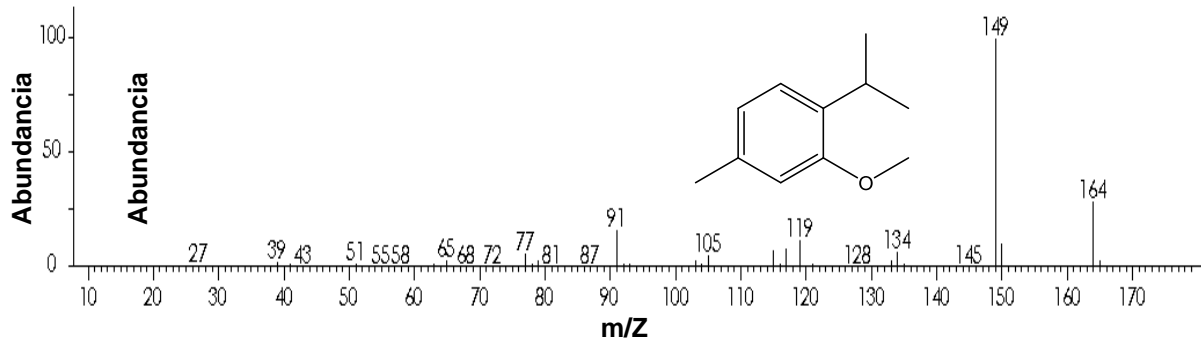
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas de la 3,3,5,6,7-pentametil, 1-indonona



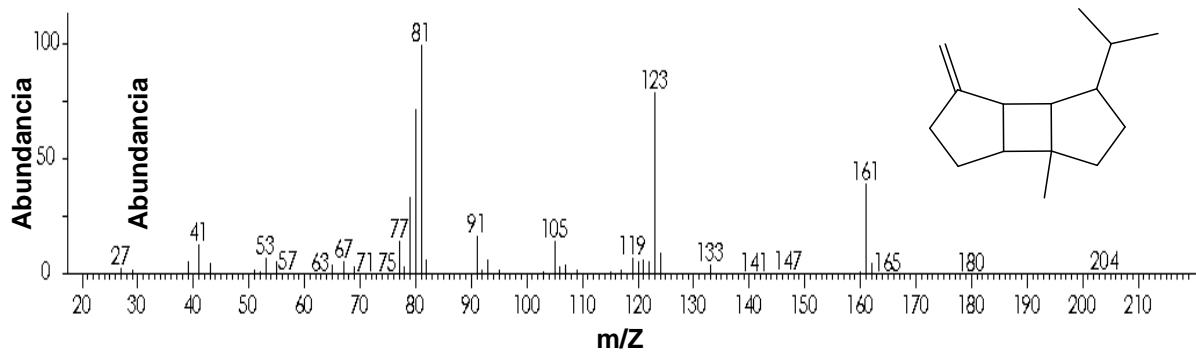


Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del *p*-octil acetofenona

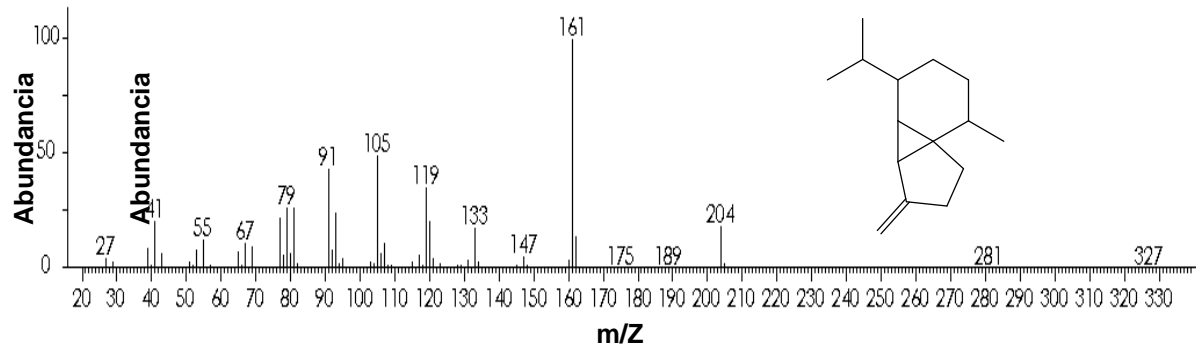
Ageratina glabrata extracto hexánico



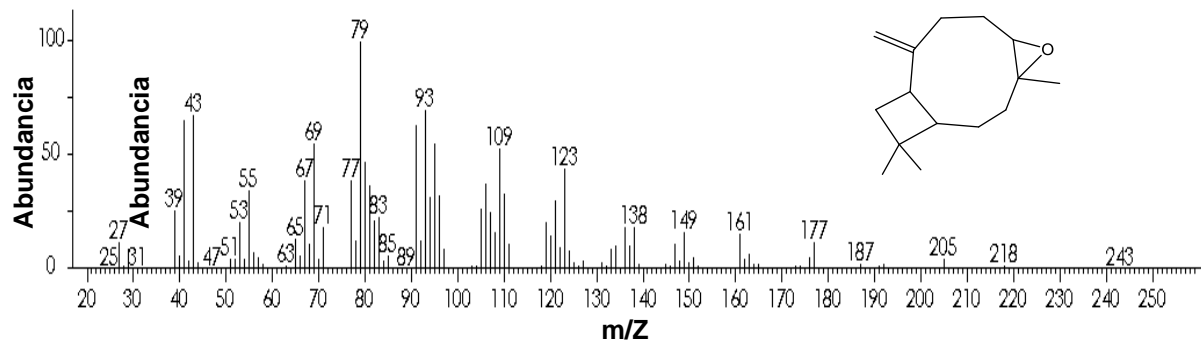
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del Metil éter de timol



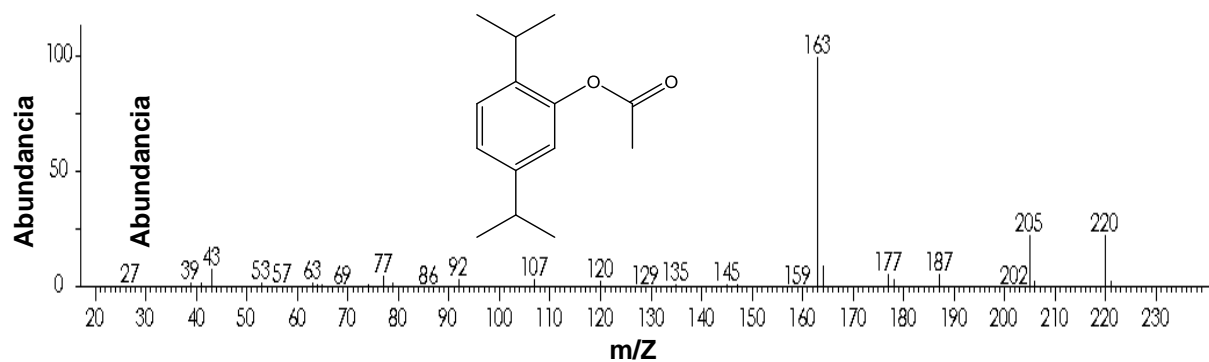
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del β -Burbureno



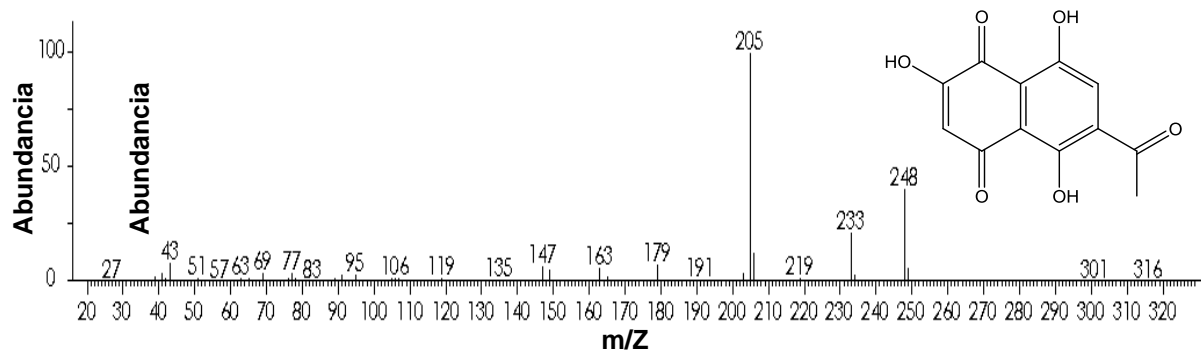
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del β -Cubebeno



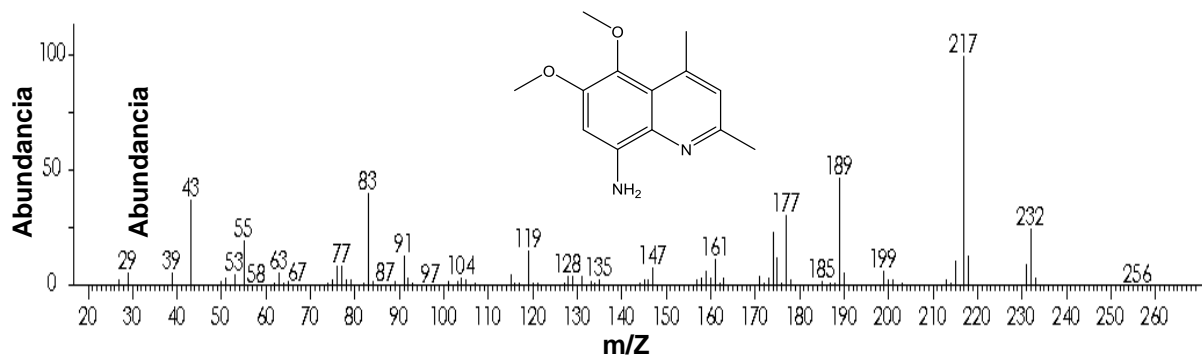
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del Oxido Cariofileno



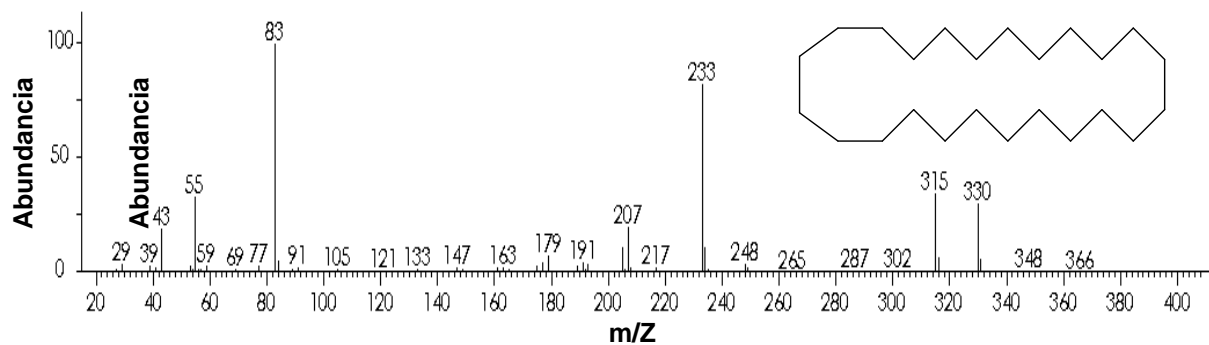
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del Acetato de carvacrol



Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del Acetato de flavoin

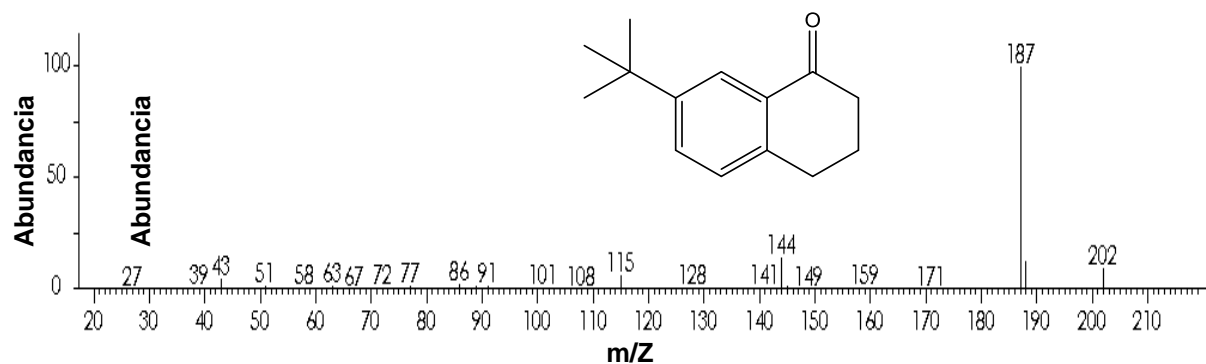


Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del 5,6-dimetoxi-2,4-dimetil-8-quinolina amina

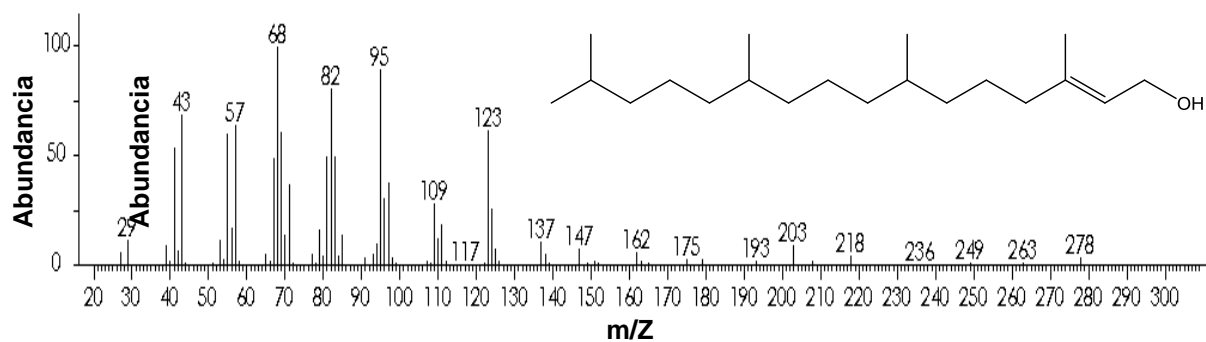


Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del Ciclo tetracosano

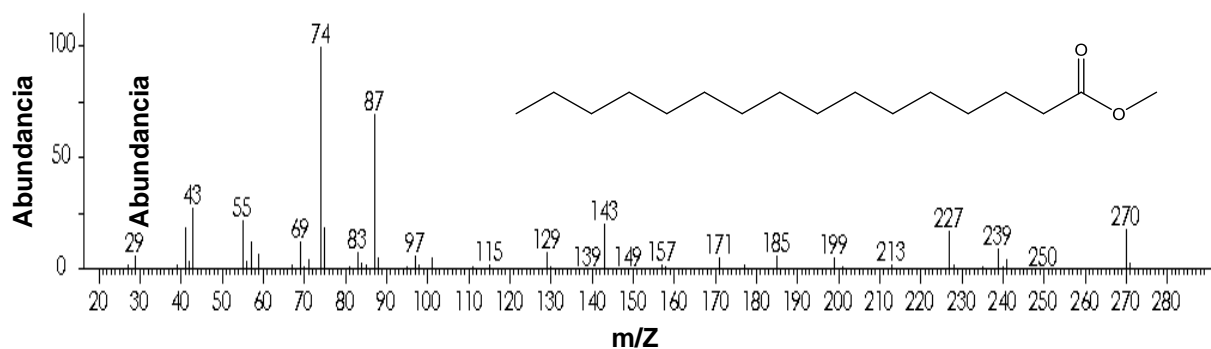
Ageratina glabrata extracto acetónico



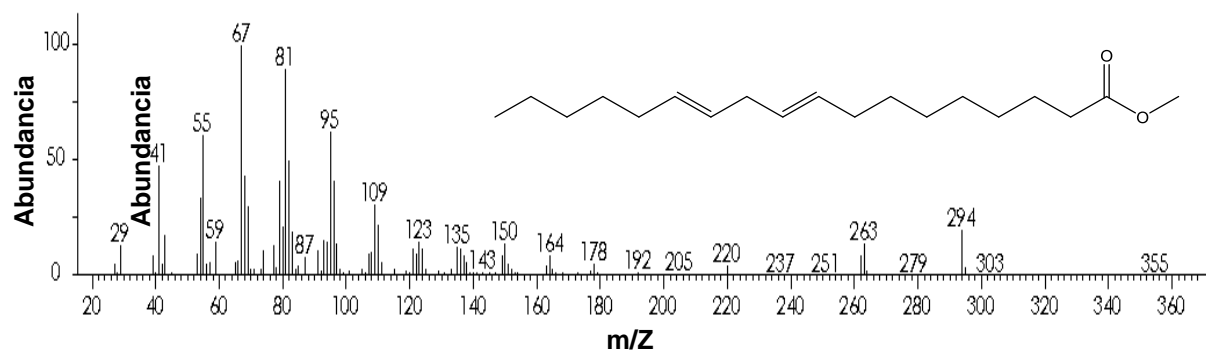
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del 7-Terbutil-1-tetralona



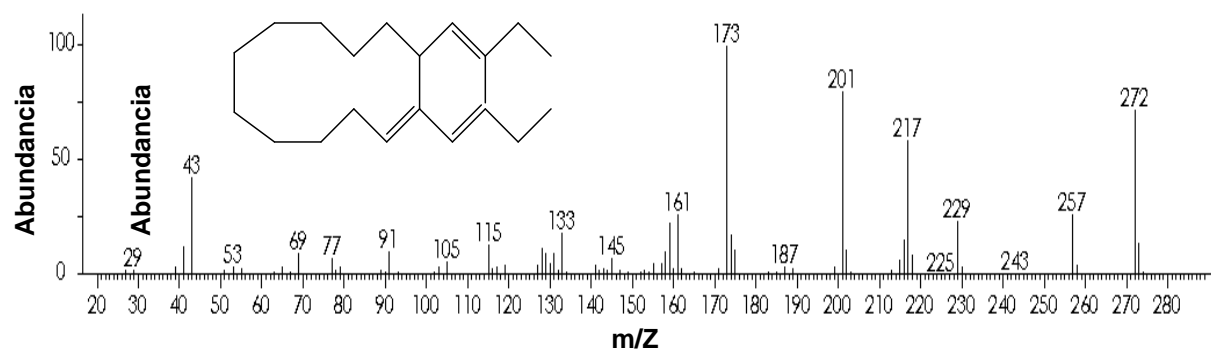
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol)



Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del metil éster del ácido hexadecanoico

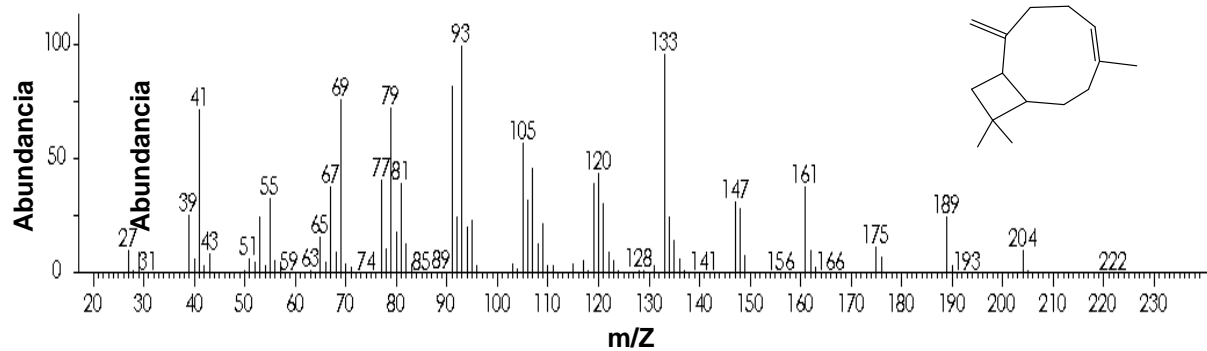


Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del metil éster del ácido 9,12-octadecadienoico

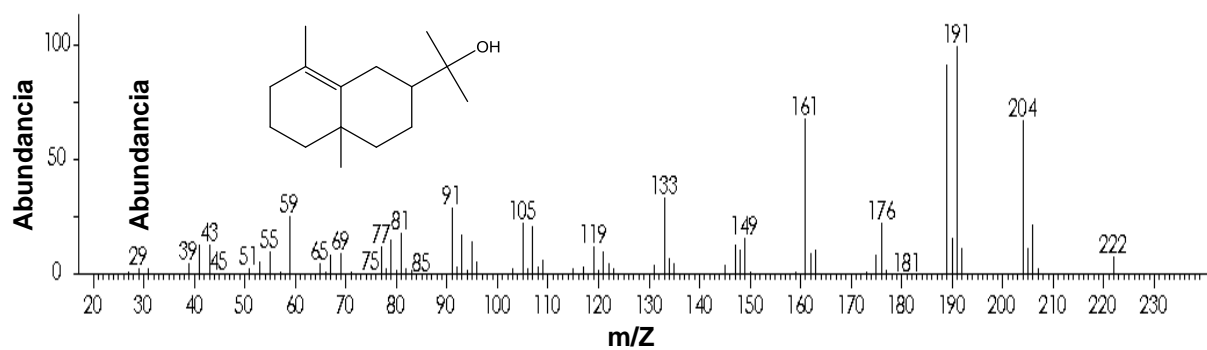


Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del 2,3-diethyl, 4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-decahidrobenzo ciclo dodeceno

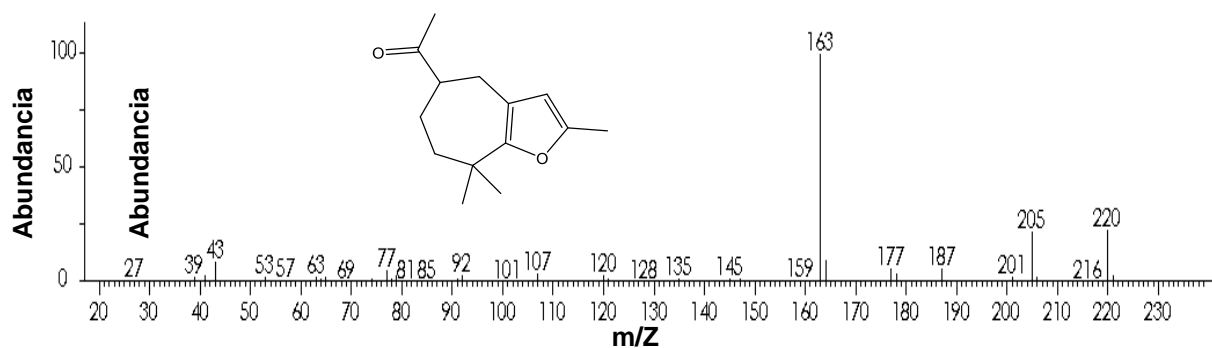
Ageratina pazcuarensis extracto hexánico



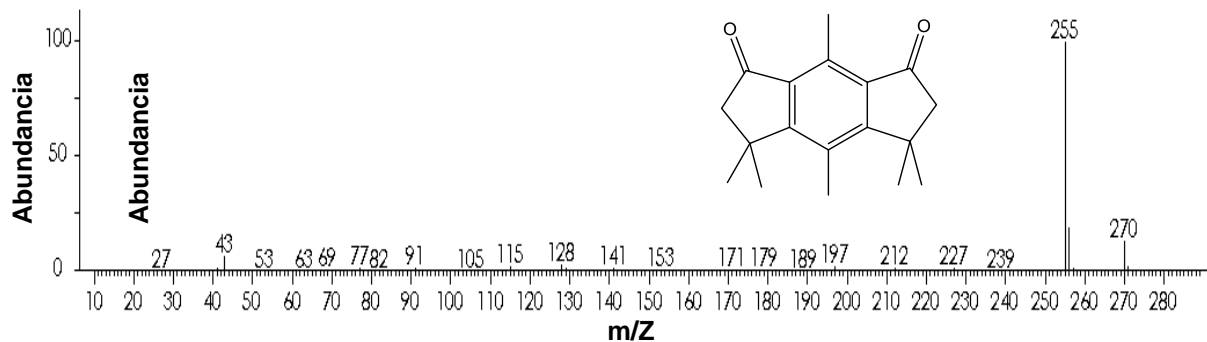
Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del Isocaradiolone



Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del γ -Edusemol



Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del Etanona, 1-(5,6,7,8-tetrahydro-2,8,8-trimetil-4H-ciclohepta[b]furan-5-il

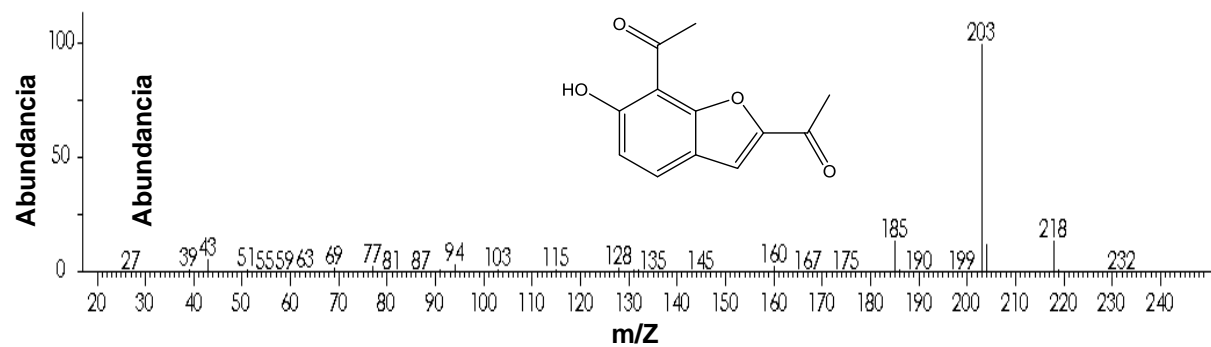


Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del 2,3,5,6-tetrahidro-3,3,4,5,5,8-hexametil-S-indacene-1,7-diona



Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del metil éster del ácido 9,12,15-octadecatrienoico

***Ageratina pazcuarensis* extracto acetónico**



Espectro de fragmentación de la espectrometría de masas del 2,7-diacetil-6-hidroxibenzofurano