



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus
novogalicianus*”**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FARMACIA
PRESENTA**

L. F. MIRIAM GUADALUPE BARON PICHARDO

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. OSCAR TORRES ANGELES**

CUERNAVACA, MORELOS MAYO 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado



MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos, 18 de noviembre de 2018
Folio: FF/D/SAc/CIP/MF/124/2018

L.F. MIRIAM GUADALUPE BARÓN PICHARDO
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado, aprobó su cambio de título de tesis y le asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus***".

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

SECRETARIO: Dra. Blanca Estela Duque Montaña

VOCAL1: Dra. Luisa Martínez Aguilar

VOCAL 2: Dra. María Crystal Columba Palomares

VOCAL 3: Dra. María Esther Ramírez Moreno

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.

Jefatura de Posgrado



ccp: archivo, Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez, Dra. Blanca Estela Duque Montaña, Dra. Luisa Martínez Aguilar, Dra. María Crystal Columba Palomares, Dra. María Esther Ramírez Moreno

mitv

Av. Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Facultad de Farmacia edif. 61 ala C,
Tel. 329 70, 00, Ext. 7986 / maestriafarmacia@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del:

Dr. Oscar Torres Ángeles, en el laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

El trabajo de Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión se realizó en la Central de Instrumentación Óptica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría de la Dra. María del Rosario Espinoza Mellado y el Dr. Oliver López Villegas.

La autora del presente trabajo recibió apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el financiamiento otorgado para la realización de este postgrado, mediante la beca No. 741821.

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido terminar una etapa muy importante en mi vida profesional, y haber puesto en mi camino a gente muy valiosa.

Al Dr. Oscar Torres Angeles, por la dirección de este trabajo, por las sugerencias, consejos y paciencia durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Virginia Flores Morales, por la proporción de los extractos de *Hemiphylacus novogalicianus* evaluados en el presente trabajo.

Agradecimiento especial a la Dra. María del Rosario Espinoza Mellado, Dra. Blanca Estela Duque Montañó y al Dr. Jesús Rivera Islas, miembros de mi comité tutorial, gracias por sus observaciones y aportaciones durante la elaboración del presente trabajo.

A la Dra. María del Rosario Espinoza Mellado y al Dr. Oliver López Villegas, por su apoyo para la realización de la Microscopia Electrónica de Barrido y la Microscopia Electrónica de Transmisión.

Y a todas las personas que contribuyeron en la realización de este proyecto, mi más profundo agradecimiento.

Dedicatorias

A mis padres, por ser un pilar importante en mi vida, que en todo momento han estado conmigo y me han brindado su apoyo y amor incondicional, sin ustedes nada hubiera sido posible, los amo con todo mi corazón.

A mis pequeñas Regina y Fátima que en todo este tiempo han estado conmigo y le han dado un significado diferente a mi vida.

A mi hermana por compartir conmigo momentos inolvidables, por todo el amor que siempre me ha brindado y sobre todo porque me ha dado el mejor regalo: mi sobrinita.

A la Dra. Blanca, al Dr. Oscar y a la Dra. Nallelyt, que me han ayudado desde del momento en que entre al laboratorio, por los momentos que hemos compartido y sobre todo por su valiosa amistad.

A mi querida amiga/ hermana Janeth, que me ha brindado su apoyo incondicional y ha estado conmigo en las buenas y en las malas.

A mis queridos amigos y compañeros de laboratorio, de los cuales he aprendido muchas cosas, pero sobre todo hemos compartido momentos inolvidables los quiero mucho; Janeth, Maye, Bety, Gris, Ulises.

I. CONTENIDO

Contenido	I	
Índice de Tablas	III	
Índice de Figuras	III	
Lista de abreviaturas	IV	
Resumen	V	
Abstract		
1.0	Introducción	1
1.1	Metabolismo primario.	3
1.2	Metabolismo secundario.	3
1.2.1	Producción de metabolitos secundarios.	3
1.2.1.1	Terpenos.	4
1.2.1.1.1	Biosíntesis de Terpenos.	5
1.2.1.2	Compuestos fenólicos.	5
1.2.1.2.1	Biosíntesis de compuestos fenólicos.	6
1.2.1.3	Glucósidos.	6
1.2.1.4	Alcaloides.	6
1.3	Productos naturales en la industria farmacéutica.	7
1.4	Métodos de obtención de extractos vegetales.	8
1.4.1	Extracción.	9
1.5	Metodologías para la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen vegetal.	11
1.5.1	Métodos de difusión.	12
1.5.1.1	Difusión en agar.	12
1.5.1.2	Método del gradiente antimicrobiano: Épsilon test (Etest)	13
1.5.2	Métodos de Dilución.	14
1.5.2.1	Dilución en agar.	14
1.5.2.2	Dilución en caldo.	15
1.5.3	Bioautografía	16
2.0	Antecedentes.	18
2.1	Composición química de la subfamilia <i>Hyacinthaceae</i> .	18
2.2	<i>Hemiphylacus novogalicianus</i> .	19

3.0	Justificación.	21
4.0	Hipótesis.	22
5.0	Objetivo general.	23
6.0	Objetivos particulares.	23
7.0	Metodología.	24
7.1	Estrategia experimental.	24
7.1	Origen de los extractos vegetales: acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> .	25
7.1.2	Soluciones Stock de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> .	25
7.1.2	Preparación de los extracto acuosos de hojas, flores y frutos de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> .	25
7.2	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano.	25
7.2.1	Cepas.	25
7.2.2	Preparación del inóculo de las cepas bacterianas.	26
7.2.3	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de los extracto acuosos de hojas, flores y frutos de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> .	
7.2.4	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de los extractos acetónico, etanólico y hexánico de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> .	26
7.3	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico	27
7.3.1	Cepas.	27
7.3.2	Condiciones de cultivo de las levaduras.	27
7.3.3	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de <i>H. novogalicianus</i> .	28
7.4	Análisis cualitativo del efecto de los extractos de <i>H. novogalicianus</i> con actividad antimicrobiana sobre los cambios morfológicos y ultraestructurales de bacterias y levaduras.	28
7.4.1	Preparación de las muestras para la Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) y Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).	28
7.4.1.1	Bacterias y Levaduras.	28
7.4.1.2	Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).	29
7.4.3	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).	30
8.0	8.0 Resultados.	31

8.1	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de los extracto acuosos de hojas, flores y frutos.	31
8.2	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico.	34
8.3	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico.	37
8.4	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).	38
8.4.1	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	38
8.4.2	Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).	40
8.4.3.1	MEB y MET en Bacterias.	40
8.4.3.2	MEB y MET en Levaduras.	44
9.0	Discusión.	46
10.0	Conclusiones.	51
11.0	Perspectivas.	52
12.0	Bibliografía.	53

II. Índice de Tablas

Tabla.	Página.
1. Disolventes más utilizados para la extracción de metabolitos secundarios.	12
2. Jerarquía Taxonómica de <i>H. novogalicianus</i>	22
3. Evaluación del efecto antibacteriano 64 µg/mL - 0.125 µg/mL.	35
4. Evaluación del efecto antibacteriano 1 mg/mL - 1.95 µg/mL.	35
5. Evaluación del efecto antibacteriano 1 mg/mL - 1.95 µg/mL con digestión simulada.	35
6. Evaluación del efecto antibacteriano 20 mg/mL a 39 µg/mL	36
7. Evaluación del efecto antifúngico 20 mg/mL a 39 µg/mL	37

III. Índice de Figuras.

Figura.	Página.
1. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.	3
2. Estructura química de Isopreno.	6
3. Principales formas de extracción de productos naturales.	11
4. Aislado de <i>E.coli</i> probado por el método de difusión en agar.	16
5. Aislado de <i>S. aureus</i> probado por el método de difusión de gradiente de E-test.	17
6. Dilución en agar	17
7. Microplaca de 96 pozos utilizada para el método de microdilución.	19
8. Bioautografía obtenida usando diferentes concentraciones de sales de tetrazolio.	20
9. Morfología de <i>H. novogalicinaus</i> .	19
10. Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos acuosos, sobre <i>E.coli</i> , con la técnica de difusión en placa con ayuda de penicilindros.	31
11. Inhibición de los extractos acuosos de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> en <i>P. aeruginosa</i> .	32
12. Inhibición de los extractos acuosos de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> en <i>E.coli</i> .	31
13. Inhibición de los extractos acuosos de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> en <i>B. subtilis</i> .	33
14. Inhibición de los extractos acuosos de <i>Hemiphylacus novogalicianus</i> en <i>S.aureus</i> .	34
15. Microscopia electrónica de Barrido en Bacterias; <i>B. subtilis</i> y <i>P. aeruginosa</i> .	39
16. Microscopia electrónica de Barrido en <i>C. albicans</i> .	40
17. Microscopia Electrónica de Transmisión de <i>B. subtilis</i> .	42
17. Microscopia Electrónica de Transmisión de <i>P. aeruginosa</i> .	43
18. Microscopia Electrónica de Transmisión de <i>C. albicans</i> .	45

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONACyT	Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPS	Dihidropteroato sintasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Dextrosa Sabouraud
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F.E.U.M.	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
µg	Microgramo
Kv	Kilovolts
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
NaCl	Cloruro de sodio
NCCLS	Comité Nacional de Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLS, por sus siglas en Ingles)
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud

P. aeruginosa

PBS

PH

S. aureus

TLC

UAEM

Pseudomonas aeruginosa

Buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en Ingles)

Potencial de Hidrogeno

Staphylococcus aureus

Cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en Ingles)

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

RESUMEN

Hemiphylacus novogalicianus es una planta endémica del Estado de Zacatecas, México, y pertenece a la subfamilia *Hyacinthaceae*, la cual químicamente se ha caracterizado por contener compuestos que poseen actividad antimicrobiana, razón por lo cual, en este trabajo se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *Hemiphylacus novogalicianus* en bacterias (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) y levaduras (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*), mediante la técnica de microdilución en placa. Los resultados mostraron que los extractos acetónico y metanólico fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. subtilis* con una Concentración Mínima Inhibitoria de 20 mg/mL, mientras que el extracto etanólico presentó una Concentración mínima inhibitoria de 10 mg/mL, por otro lado, el extracto hexánico inhibió el crecimiento de *E. coli* y *P. aeruginosa* con una Concentración Mínima Inhibitoria de 20 mg/mL respectivamente y de 5 mg/mL para *B. subtilis*. Respecto a la evaluación antifúngica, únicamente el extracto hexánico mostró inhibición del crecimiento de *C. albicans* y *C. tropicalis* con una concentración mínima inhibitoria de 20 mg/mL, y de 10 mg/mL para *C. glabrata*.

Finalmente se realizó Microscopia Electrónica de Barrido y Microscopia Electrónica de Transmisión con la finalidad de determinar los daños morfológicos y ultraestructurales sobre los microorganismos expuestos al extracto hexánico; en bacterias (*P. aeruginosa* y *B. subtilis*) se observaron alteraciones a nivel de material genético y citoplasma, mientras que los cultivos de levaduras (*C. albicans*) expuestos al extracto hexánico mostraron alteraciones en el núcleo, mitocondrias y vacuolas, todo ello en comparación con los cultivos no tratados, los cuales mostraron morfología característica sin alteraciones.

-

Abstract

Hemiphylacus novogalicianus is an endemic plant of Zacatecas, Mexico, and belongs to the *Hyacinthaceae* subfamily, which are chemically characterized by containing compounds possessing antimicrobial activity. In this work the antimicrobial effect of the extracts was determined acetonic, ethanolic, hexanic and methanolic of *Hemiphylacus novogalicianus* in bacteria (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*) and yeasts (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*), using the plate microdilution technique. The results showed that the acetonic and methanolic extracts were able to inhibit the growth of *B. subtilis* with a minimum inhibitory concentration of 20 mg/mL, while the ethanolic extract showed a minimum inhibitory concentration of 10 mg/mL, on the other hand, the hexanic extract inhibited the growth of *E. coli* and *P. aeruginosa* with a minimum inhibitory concentration of 20 mg/mL and 5 mg/mL for *B. subtilis*. About the antifungal evaluation, only the hexane extract showed growth inhibition of *C. albicans* and *C. tropicalis* with a minimum inhibitory concentration of 20 mg/mL, and 10 mg/mL for *C. glabrata*.

Finally Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy was performed in order to determine the morphological and ultrastructural damage on microorganisms exposed to hexane extract; in bacteria (*P. aeruginosa* and *B. subtilis*) changes the level of genetic material and cytoplasm were observed, while yeast cultures (*C. albicans*) exposed to hexane extract showed alterations in the nucleus, mitochondria and vacuoles, all in compared to untreated cultures, which showed characteristic morphology unaltered.

1.0 Introducción.

Durante siglos, los seres humanos nos hemos auxiliado de la naturaleza para satisfacer las necesidades básicas como: vestimenta, uso de fertilizantes, condimentos, fragancias, alimentación y medicamentos (Aoki y cols., 2005; Atanasov y cols., 2015). Las plantas medicinales se utilizan en diferentes países y en México han constituido la base para el desarrollo de la medicina tradicional aplicada desde hace miles de años. Dentro de la medicina tradicional, las especies con propiedades curativas juegan un papel importante. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a una planta medicinal como “Aquella planta que en uno o más de sus órganos, contenga sustancias que pueden utilizarse con fines terapéuticos o que sean precursores para la semi-síntesis químico- farmacéutica” (Shing, 2011). Las plantas medicinales son una buena fuente para la obtención de nuevos fármacos que pudieran ser utilizados para el tratamiento de numerosas enfermedades, cabe destacar que representan una rica fuente de agentes antimicrobianos, lo cual resulta conveniente debido al aumento en la resistencia a ellos, lo cual ha conducido a la selección de numerosas plantas medicinales para evaluar su actividad antimicrobiana (Aoki y cols., 2005; Araby y Tablaw, 2016; Abdelaaty y cols., 2017).

Los servicios de salud son una de las necesidades más sentidas en las comunidades en México, debido a que son insuficientes, o porque las personas que viven en las regiones rurales no tienen los recursos económicos como para utilizar un servicio médico particular por tal situación tienen que recurrir al uso de las plantas medicinales. Ante esto las plantas medicinales juegan y han jugado a través de la historia de la humanidad un papel importante en la solución de un número considerable de problemas inmediatos a la salud (Magaña y cols., 2010).

Un producto natural es un compuesto químico de bajo peso molecular (generalmente menor de 1500 uma) que es sintetizado por organismos biológicos (Breinbauer y cols., 2002), en un sentido más restrictivo un producto natural sólo es un metabolito secundario (Gutiérrez y Estévez, 2009).

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas

las plantas a ellos se les denominan metabolitos primarios (Figura 1) (Ávalos y Pérez, 2009). A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y son denominados metabolitos secundarios (Figura 1). Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez, 2009; Avendaño, 2010.).

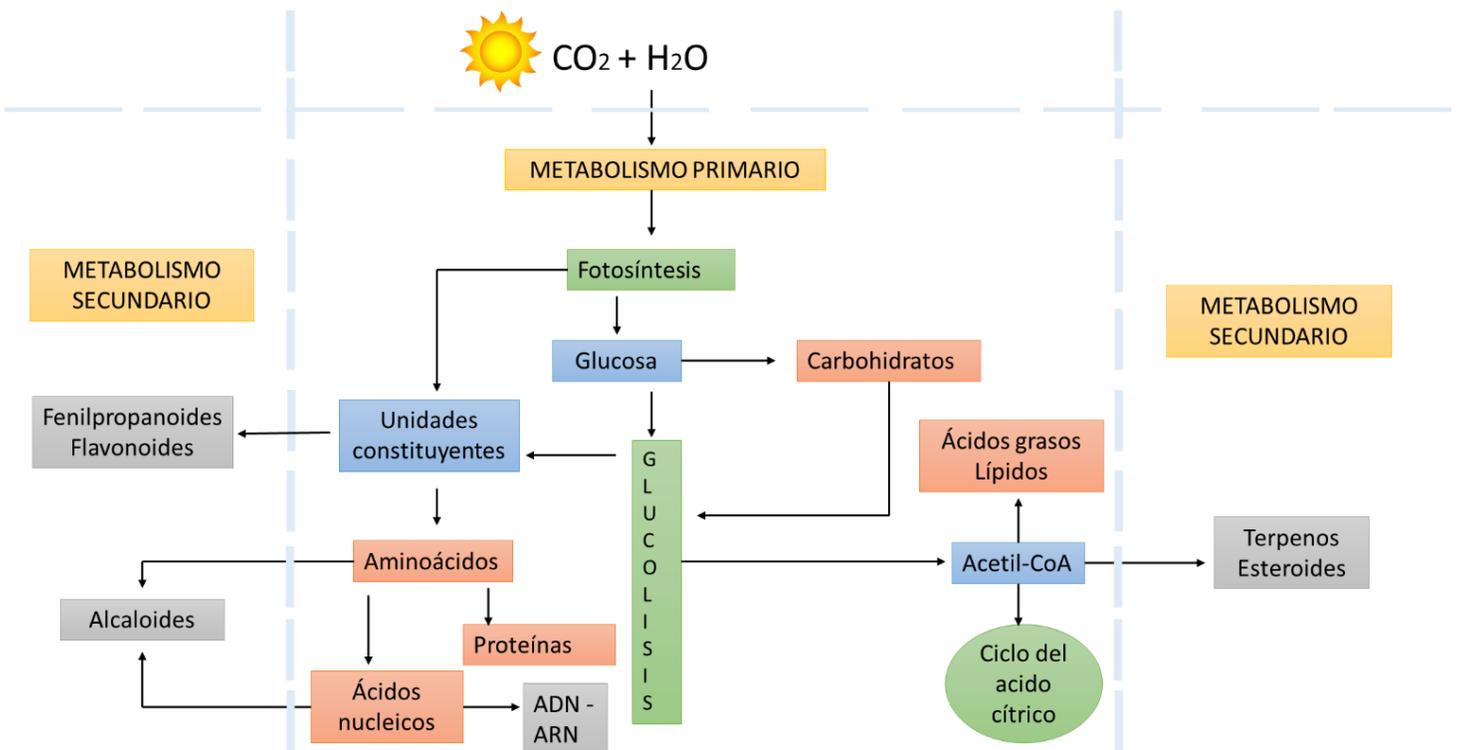


Figura 1. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas (Modificado de Ávalos y Pérez, 2009).

1.1 Metabolismo primario.

El metabolismo primario compromete aquellos procesos químicos que cada planta debe llevar a cabo cada día para sobrevivir y reproducirse, como son:

- Fotosíntesis
- Glicolisis
- Ciclo del ácido cítrico
- Síntesis de aminoácidos
- Transaminación
- Síntesis de proteínas
- Síntesis de enzimas y coenzimas
- Duplicación del material genético
- Reproducción de células (crecimiento)
- Absorción de nutriente

Las biomoléculas que son constituyentes fundamentales en procesos vitales como los ya mencionados son denominados metabolitos primarios. Estos metabolitos tienen distribución taxonómica amplia. Se puede considerar que los metabolitos primarios por excelencia son la glucosa, la ribosa, la fructosa, el ácido pirúvico, el gliceraldehído, el ácido acético (Esterificado como acetil coenzima A), el ácido oxaloacético, el ácido málico, el ácido 2-oxoglutarico, el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido oleico, el porfobilinógeno, el pirofosfato de isopentenilo, los 20 aminoácidos proteínicos, las bases púricas, las bases pirimidínicas y las Vitaminas del grupo B (Dewick, 2009).

1.1 Metabolismo secundario

El metabolismo secundario a aquél conjunto de reacciones bioquímicas que se producen de forma paralela al metabolismo primario. Estos compuestos se caracterizan por presentar una distribución muy limitada y la clase de compuestos sintetizados en ella son conocidos como metabolitos secundarios, que son encontrados sólo en cierto tipo de organismos, por lo que su producción se encuentra restringida a un determinado género, familia e incluso especies (Dewick, 2009).

1.2.1 Producción de metabolitos secundarios.

La producción de metabolitos secundarios deriva del metabolismo primario. Los bloques de producción necesarios para la síntesis de metabolitos secundarios pueden ser pocos, pues la mayoría de los empleados deriva de intermediarios del metabolismo primario como acetil-

CoA, ácido shikímico, ácido mevalónico y 1-desoxixilulosa-5-fosfato, que son empleados en las vías del acetato/ mevalonato, ácido shikímico, y fosfato-desoxixilulosa respectivamente. Las moléculas de acetyl-CoA, son formadas en la glicólisis como producto de descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, al igual que en la oxidación de los ácidos grasos. Existen metabolitos secundarios que son formados a partir de la vía del acetato, como es el caso de fenoles, prostaglandinas y macrólidos. El ácido shikímico, permite la formación de metabolitos como fenoles, derivados del ácido cinámico, lignanos (estrógenos de las plantas) y alcaloides. El ácido mevalónico participa en la producción de los mismos metabolitos que se forman en la vía del acetato. En cuanto a la desoxixilulosa-5-fosfato, resulta de la combinación de dos intermediarios de la glicólisis, el ácido pirúvico y el gliceraldehído-3-fosfato, y es responsable de la biosíntesis de una gran cantidad de terpenoides y esteroides (Dewick, 2009).

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales:

1. Terpenos: entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
2. Compuestos fenólicos: cumarinas, flavonoides, lignanos y taninos.
3. Glicósidos: saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
4. Alcaloides: alcaloides verdaderos, protoalcaloides, pseudoalcaloides, alcaloides imperfectos (Ávalos y Pérez, 2009; Arango, 2008).

1.2.1 Terpenos.

Los terpenos son un amplio grupo de compuestos que se caracterizan por estar formados por la unión de unidades pentacarbonadas ramificadas relacionadas con el 2-metil-1,3-

butadieno (Isopreno, Figura 2.). Según formen parte de su esqueleto hidrocarbonado, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 8 unidades pentacarbonadas (C5), los terpenos se clasifican en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Bonkanka, 2006, Bennett y Wallsgrove, 2006).

Los terpenos de las plantas son extensamente usados por sus cualidades aromáticas. Juegan un rol importante en la medicina tradicional y en los remedios herbolarios, y se están investigando sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos. Están presentes, por ejemplo, en las esencias del eucalipto, los sabores del clavo y el jengibre (Bennett y Wallsgrove, 2006).

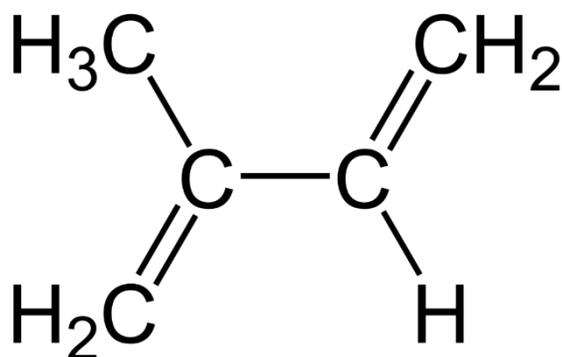


Figura 2. Estructura química de Isopreno

1.2.1.1 Biosíntesis de Terpenos.

Los terpenos se biosintetizan mediante un cierto número de repeticiones de una molécula de cinco átomos de carbono (C5): el pirofosfato de isopentenilo (IPP) o isopreno activo. El IPP puede ser sintetizado por dos rutas diferentes:

- La ruta clásica, citosólica, del mevalonato que parte de Acetil CoA.
- La ruta alternativa, plastídica, que consiste en la condensación de gliceraldehído-3-fosfato e hidroxietiltiamina (producto de la descarboxilación del piruvato) (Bonkanka, 2006).

1.2.2 Compuestos fenólicos.

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un

grupo funcional. Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos. Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles. Este grupo también juega una variedad muy heterogénea de roles en las plantas, roles que son atribuidos en general a los productos secundarios de las plantas: muchos son productos de defensa ante herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta, otros atraen polinizadores o dispersores de frutos, algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos (Bennett y Wallsgrave, 2006).

1.2.2.1 Biosíntesis de compuestos fenólicos.

Hay dos vías principales a través de las cuales se sintetizan los compuestos fenólicos en la naturaleza: vía del acetato/mevalonato y vía del ácido shikímico. Ambas vías pueden generar compuestos con el mismo esqueleto, como por ejemplo las quinonas, o pueden conjugarse formando compuestos de origen mixto, como ocurre con los flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002).

1.2.3 Glucósidos.

Los glucósidos son moléculas compuestas por un glúcido (generalmente monosacáridos) y un compuesto no glucídico. Muchas plantas almacenan los productos químicos importantes en forma de glucósidos inactivos; si estos productos químicos son necesarios, se hidrolizan en presencia de agua y una enzima, generando azúcares importantes en el metabolismo de la planta. Muchos glucósidos de origen vegetal se utilizan como medicamentos (Hernández, 2015).

Los glucósidos son sustancias altamente activas. Teniendo en cuenta su composición química y su acción fisiológica los podemos clasificar en: Glucósidos antocianínicos, antraquinónicos, cianogenéticos, cardiotónicos, fenólicos, flavonoides, cumarínicos, saponínicos y sulfurados (Hernández, 2015).

1.2.4 Alcaloides.

Son compuestos orgánicos de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenados (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de

aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación. La mayoría de los alcaloides poseen acción fisiológica intensa en los animales incluso a bajas dosis con efectos psicoactivos, por lo que son muy usados en medicina para tratar problemas de la mente y calmar el dolor. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, cafeína, la estricnina y la nicotina. De acuerdo a las características de esta definición, algunos autores han dividido a los alcaloides en cuatro clases (Arango, 2008):

1. **Alcaloides verdaderos** cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloide, son formados a partir de aminoácidos, tienen siempre un nitrógeno intracíclico, son de carácter básico y existen en la naturaleza normalmente en estado de sal.
2. **Protoalcaloides** son aminas simples con nitrógeno extracíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos.
3. **Pseudoalcaloides** presentan algunas de las características de la definición de alcaloide, pero no son derivados de aminoácidos.
4. **Alcaloides imperfectos** son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

1.3 Productos naturales en la industria farmacéutica.

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o industrial (Gutiérrez y Estévez, 2009).

La medicina moderna, a través de los análisis químicos, ha conseguido precisar la validez de aquellas plantas que la medicina tradicional había utilizado con base en el método de ensayo y error. Han sido precisamente los análisis químicos los que han podido determinar cuáles son los componentes principales de las plantas medicinales; y los llamados "principios activos". Se estima que unos 120 productos farmacéuticos derivan directamente de las plantas medicinales y también un 25 % de las medicinas actuales contienen algún principio activo que deriva de plantas medicinales (Martínez, 2005).

De los 1010 nuevos fármacos aprobados por la FDA desde enero de 1981 hasta junio de 2006, 43 eran productos naturales inalterados y 232 (un 23%) eran derivados de productos naturales encuadrados en la denominada segunda generación. Dentro de éstos encontramos al docetaxel (Taxotere®), un análogo de paclitaxel (Taxol®) más potente y más soluble, y a los antibióticos claritromicina (Biaxin®) Y azitromicina (Zitromax®), ambos derivados de eritromicina (Avendaño López, 2010).

Los productos naturales son estructuras privilegiadas en la búsqueda de nuevos fármacos porque son excelentes cabezas de serie, verificados biológicamente en el diseño de quimiotecas de compuestos con el fin de originar un nuevo fármaco (Jiménez, 2013). El éxito de los productos naturales radica en que son compuestos que ya han sido validados por la evolución, han sido biosintetizados, degradados, y transformados por sistemas enzimáticos. Por tanto a la hora de interactuar con las moléculas dianas lo realizarán de una manera privilegiada. De esta forma los productos sintéticos sólo tendrán éxito cuando imiten a los Productos Naturales (Gutiérrez y Estévez, 2009).

1.4 Métodos de obtención de extractos vegetales.

Los extractos se preparan separando la materia soluble de los tejidos vegetales mediante la aplicación de un disolvente adecuado como alcohol, agua o éter. El líquido resultante se concentra por evaporación para obtener un extracto líquido o se concentra casi a sequedad para obtener el extracto sólido. Depende del disolvente utilizado, los extractos se clasifican como alcohólicos, etéreos o acuoso. La materia prima para tal proceso puede ser: flores, hojas, ramas, corteza, rizomas, semillas y frutos. Los productos fitoterapéuticos tienen una composición química variable y por consiguiente son definidos por el proceso de extracción. (Shing, 2011).

El extracto de plantas estandarizado es una preparación, que contiene determinada proporción del componente activo. El aspecto más obvio de la estandarización es el contenido garantizado de uno o más constituyentes activos, sin embargo la normalización implica mucho más que los niveles garantizados de constituyentes. La estandarización tiene un gran impacto en la calidad de los productos y ayuda a ajustar la formulación de fármacos a base de plantas (Shing, 2011).

Existen diferentes factores que influyen en la composición química de los productos fitoterapéuticos. Dentro de ellos encontramos a los factores intrínsecos tienen que ver con

la planta en sí misma. La presencia o ausencia de sustancias farmacológicamente activas pueden variar bastante dentro de las especies. La composición química cambia también de acuerdo con el lugar donde fue realizada la recolección, condiciones climáticas y del suelo, la época del año, así como las diferentes técnicas de cultivo. La técnica más común para extraer o separar los componentes activos a partir de plantas, es conocida como extracción (Shing, 2011).

1.4.1 Extracción.

La extracción consiste en la separación de las sustancias biológicamente activas de los materiales inertes o inactivos de una planta, a partir de la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado; donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo (bagazo). En la figura 3 se observan las principales formas de extracción (Molina Murillo, 2012).

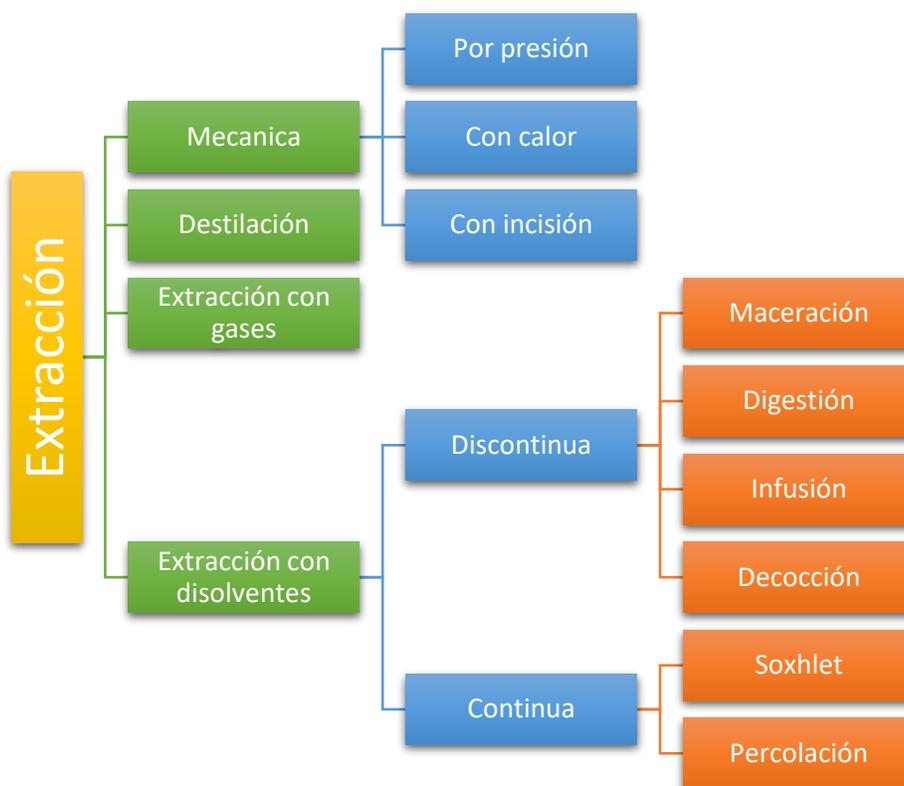


Figura 3. Principales formas de extracción de productos naturales.

Respecto a la extracción con disolventes, éste se pone en contacto con los sólidos de la planta, y penetra por capilaridad, el disolvente entra en las células vegetales y disuelve parte de los componentes. Aquellos que presenten buena solubilidad, se disuelven fácilmente y son extraídos, mientras que otros permanecen atrapados en los capilares vegetales o son absorbidos por las mismas estructuras celulares. De tal manera que los componentes disueltos son transferidos del interior de la célula a los capilares y de los capilares hacia el disolvente que permanece fuera de la planta, lográndose así una transferencia de masa (Shing, 2011).

La elección de un disolvente adecuado depende principalmente del tipo de compuesto que se quiera extraer. En la tabla 1 se encuentran algunos de los principales disolventes utilizados para la extracción de compuestos fitoquímicos (Murphy, 1999).

Tabla 1. Disolventes más utilizados para la extracción de metabolitos secundarios

Compuestos a extraer	Disolventes						
	Agua	Etánol	Metánol	Cloroformo	Éter	Acetóna	Hexáno
	Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoles	Alcanos
	Almidones	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides	Terpenoides		Ácidos grasos
	Paninos	Poliacetilenos	Saponinas		Cumarinas		Ceras
	Saponinas	Flavonoles	Quasinoideas		Ácidos grasos		Esteroides
	Terpenoides	Terpenoides	Flavonas				Terpenoides
	Polipéptidos	Esteroides	Polifenoles				Cumarinas
	Lectinas	Alcaloides	Taninos				Alcaloides

Una de las principales técnicas de extracción con uso de disolventes es la maceración, la cual es un proceso de extracción sólido- líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Shing, 2011; Murphy, 1999; Becerra, 2011).

1.5 Metodologías para la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen vegetal.

Los microbiólogos clínicos tienen dos razones importantes para estar interesados en el tema de los extractos de plantas con posible actividad antimicrobiana. En primer lugar es muy probable que dentro de estos fitoquímicos se encuentre el arsenal de fármacos antimicrobianos que puedan ser utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas resistentes a los antimicrobianos utilizados hoy en día, ya que la vida útil efectiva de los antimicrobianos utilizados es limitada. En segundo lugar, las personas están más conscientes cada vez de los problemas con la prescripción excesiva y el mal uso de los antibióticos tradicionales, por ello muchas de ellas están interesadas en tener más autonomía sobre su atención médica. Una multitud de compuestos vegetales (a menudo de pureza no confiable) está fácilmente disponible sin receta de proveedores de hierbas y tiendas de alimentos naturales, y la automedicación con estas sustancias es algo habitual (Murphy, 1999, Mounyr y cols., 2016).

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser utilizados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de los microorganismos ante diferentes agentes antimicrobianos, pero estos métodos no son igualmente sensibles o se basan en los mismos principios (Ramírez y Castaño, 2009).

La selección inicial de posibles compuestos antibacterianos y antifúngicos de plantas puede realizarse con sustancias puras o extractos crudos (Murphy, 1999, Afolayan, 1997, Mounyr y cols., 2016). Las metodologías utilizadas para la evaluación antibacteriana y antifúngica de extractos de origen vegetal son muy similares, estas técnicas se pueden clasificar principalmente en métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía (Ramírez y Castaño, 2009; Murphy, 1999). La selección de extractos de plantas para la actividad contra protozoos y helmintos puede ser más complicada que la detección de actividad contra bacterias, hongos o virus. El cultivo de los organismos es a menudo más difícil y se obtienen menos organismos. Los ensayos son generalmente específicos para el microorganismo. Aunque en teoría cualquiera de los métodos anteriores podría utilizarse para hallar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales cada uno posee ciertos inconvenientes, razón por la cual en el momento de realizar las pruebas se deben hacer modificaciones para que estas metodologías sean adecuadas, reproducibles y fiables (Rojas y cols., 2005, Faisal y cols., 2010, Calzada y cols., 2017) .

1.5.1 Métodos de difusión.

Los métodos de difusión han sido ampliamente utilizados para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión para estudiar compuestos polares y no polares (Ramírez y Castaño, 2009).

1.5.1.1 Difusión en agar.

El método de difusión en agar, es simple y práctico, además presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles ya que ha sido bien estandarizado, de los métodos de sensibilidad antibacteriana es el que tiene un menor costo. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (método de Kirby- Bauer) y es uno de los métodos que el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El fundamento de esta determinación es, establecer de forma cualitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente sobre las cepas bacterianas. Este método consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes compuestos a evaluar. Tan pronto el disco impregnado se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el compuesto difunde al agar. El compuesto difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración, transcurrido el tiempo de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Figura 4) (Ramírez y Castaño, 2009; Mounyr y cols., 2016). La susceptibilidad del microorganismo en prueba está relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros. Los microorganismos se denominan susceptibles, intermedios o resistentes según sea el tamaño del halo de inhibición (López- Malo y cols., 2005; Mounyr y cols., 2016; Jorgensen y Ferraro, 2009).

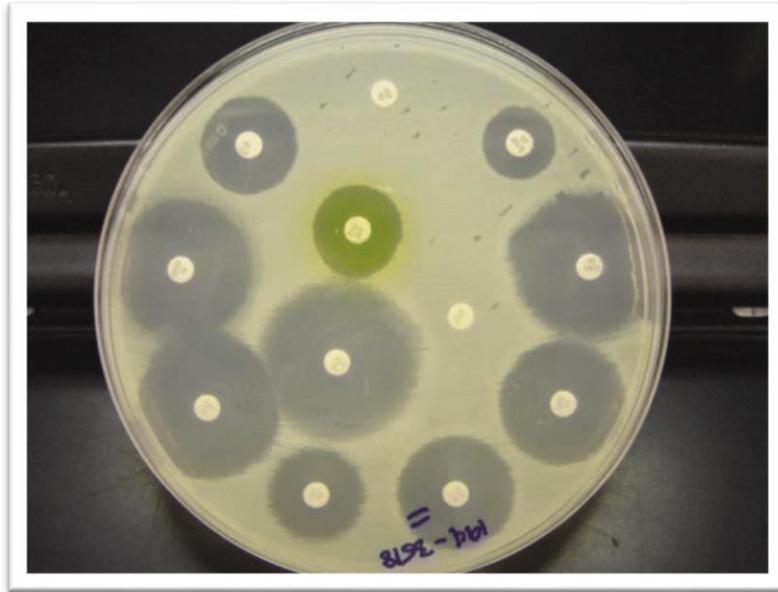


Figura 4. Aislado de *Escherichia coli* probado por el método de difusión en agar. Tomada de Ferraro, 2009.

1.5.1.2 Método del gradiente antimicrobiano: Épsilon test (Etest)

Este método combina el principio del método de difusión y dilución, utiliza el principio de establecimiento de un gradiente de concentración antimicrobiana en un medio de agar como un medio para determinar la susceptibilidad. El Etest (bioMérieux AB BIODISK) (Figura 5) es una versión comercial disponible que emplea finas tiras de prueba de plástico que se impregnan en la parte inferior con un gradiente de concentración de antibióticos secos y se marcan en la superficie superior con una escala de concentración. Pueden colocarse hasta 5 ó 6 tiras de forma radial en la superficie de una placa de agar apropiada que haya sido inoculada con el microorganismo como en el caso de la prueba de difusión en disco. Después la incubación, las pruebas se leen observando las tiras desde la parte superior de la placa. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determina por la intersección de la parte inferior del área de inhibición del crecimiento en forma de elipse con la tira de ensayo (Mounyr y cols., 2016; Jorgensen y Ferraro, 2009). El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CMI (Picazo, 2000).



Figura 5. Aislado de *S. aureus* probado por el método de difusión de gradiente de Etest con vancomicina (VA), daptomicina (DM), y linezolid (LZ) en agar Mueller-Hinton. Tomada de Jorgensen y Ferraro, 2009.

1.5.2 Métodos de Dilución.

Los métodos de dilución en agar o en caldo son utilizados para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado que inhibe el crecimiento visible del microorganismo ensayado, y es reportado en mg/mL o $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos métodos pueden utilizarse para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos (Mounyr y cols., 2016).

1.5.2.1. Dilución en agar

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración del agente antimicrobiano (incluyendo los extractos vegetales), luego se inoculan con el microorganismo a evaluar y se incuban, pasando el tiempo de incubación se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Figura 6) (Ramírez y Castaño, 2009).

Dilución en agar.

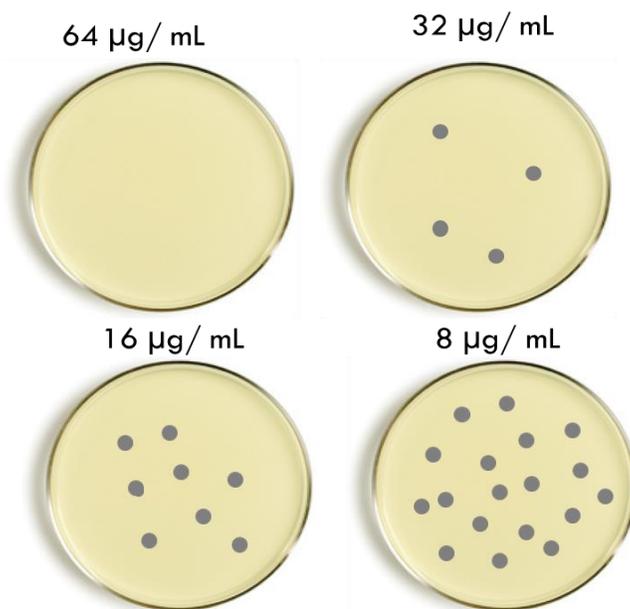


Figura 6. Dilución en agar.

1.5.2.2 Dilución en caldo.

La dilución en caldo es uno de los métodos más básicos de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, en estos métodos se puede analizar el efecto antibacteriano, antifúngico e incluso el efecto antiparasitario de diferentes compuestos incluyendo los extractos vegetales (Jorgensen y Ferraro, 2009; Mounyr y cols., 2016).

Uno de los primeros métodos de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos fue la macrodilución en tubos. Este procedimiento implica la preparación de dos diluciones de antibióticos (por ejemplo, 1, 2, 4, 8 y 16 µg / mL) en un medio de crecimiento líquido dispensado en tubos de ensayo. Los tubos que contienen antibióticos se inoculan con una suspensión bacteriana estandarizada a 0.5 en la escala del nefelómetro de Mc Farland (1×10^8 UFC/mL). Después de una incubación durante la noche a 35 ° C, se examinan los tubos para determinar el crecimiento bacteriano visible por turbidez. La menor concentración de antibióticos que inhiba el crecimiento representa la concentración mínima inhibitoria (CMI). La ventaja de esta técnica es la generación de un resultado cuantitativo (es decir, la CMI). Las desventajas principales del método de microdilución son la tediosa tarea manual de preparar las soluciones antibióticas para cada ensayo, la posibilidad de errores en la

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*.

preparación de las soluciones antibióticas y la cantidad relativamente grande de reactivos y el espacio necesario para cada ensayo (Jorgensen y Ferraro, 2009; Mounyr y cols., 2016).

La miniaturización y mecanización de la prueba mediante el uso de pequeñas bandejas de microdilución de plástico desechables (Figura 7) ha hecho que la prueba de dilución en caldo sea práctica y popular. Las bandejas estándar contienen 96 pocillos, cada uno contiene un volumen de 0,1 ml que permite que aproximadamente 12 antibióticos sean probados en un rango de 8 diluciones de dos veces en una sola bandeja. Los paneles de microdilución se preparan típicamente usando instrumentos dispensadores que alícuotan volúmenes precisos de posibles agentes antimicrobianos pre-pesados y diluidos en caldo en los pocillos individuales de bandejas de vasos de gran volumen. Después de la incubación, las CMI se determinan usando un dispositivo de visualización manual o automatizado para la inspección de cada uno de los pocillos del panel para crecimiento (Jorgensen y Ferraro, 2009).

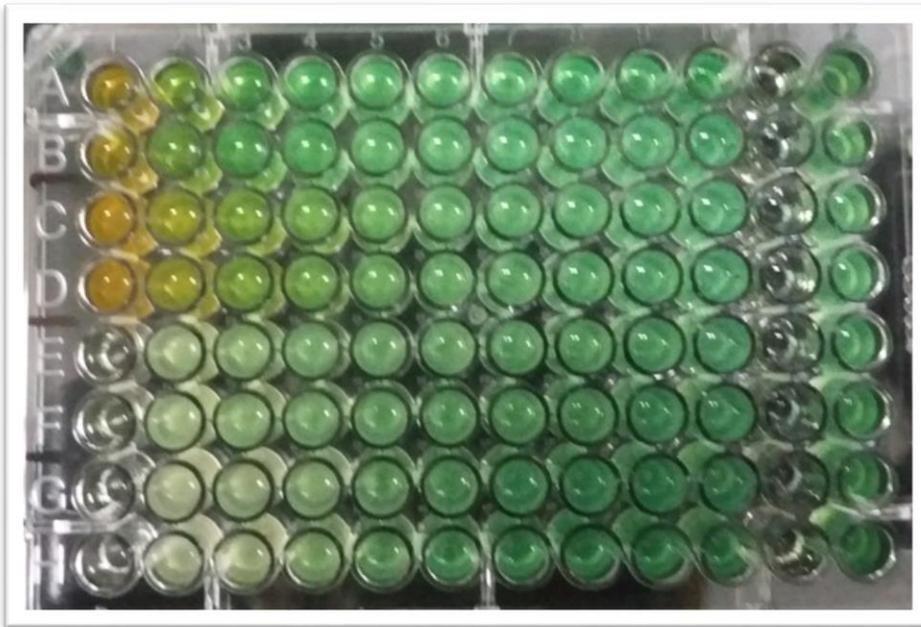


Figura 7. Evaluación antibacteriana de Trimetoprim con Sulfametoxazol (E, F, G y H) contra *P. aeruginosa* a una concentración de 64 $\mu\text{g/mL}$ probado por el método de microdilución en placa de 96 pozos.

1.5.3. Bioautografía

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fotoquímico preliminar ó un fraccionamiento biodirigido, realizando el ensayo a través de cronogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía en capa fina (TLC), el método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada de forma invertida sobre una caja Petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se coloca a una temperatura de 4-12 °C durante algunas horas, para facilitar la difusión de las sustancias en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo, finalmente se observa la zona de inhibición donde está el compuesto activo, para visualizar mejor los resultados se puede añadir alguna sal de tetrazolio (Figura 8) (Ramírez y Castaño, 2009).

Esta técnica ha sido aplicada exitosamente para la detección de las sustancias antimicrobianas de extractos de plantas en tejidos de órganos animales como hígado y riñón y en alimentos como la leche (Ramírez y Castaño, 2009; Colorado y cols., 2007).

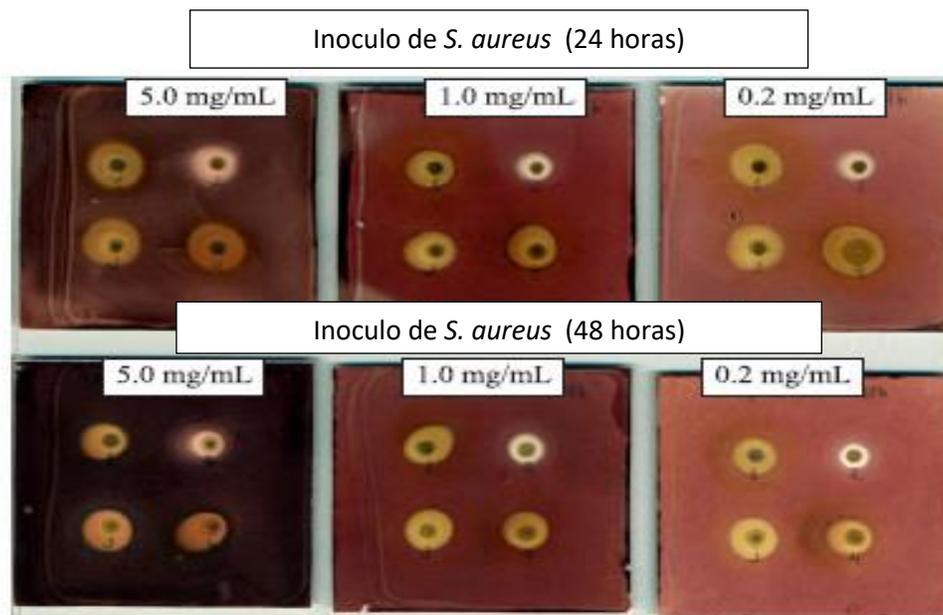


Figura 8. Bioautografía obtenida usando diferentes concentraciones de sales de tetrazolio (indicador), en inóculos de *S. aureus*. Tomada de Valgas y cols., 2007.

2.0 Antecedentes.

Dado que muy a menudo las plantas se recogen directamente de su hábitat natural, la identificación y la nomenclatura correctas son la base para cualquier investigación respecto a la actividad biológica que se le pudiera atribuir a dicha planta. Para una identificación inequívoca, es necesaria la combinación de métodos, como el análisis genético y químico, además de la caracterización morfológica y anatómica (Domínguez, 1985, Bucar y cols., 2013, Atanasov y cols., 2015). Cabe señalar que la recolección del material vegetal, Identificación botánica, así como la preparación del extracto, son tareas que no pueden ser automatizadas y se necesitan especialistas capacitados para realizar estas labores (David y cols., 2015).

La familia *Liliaceae* es una de las familias de plantas más grandes existentes en el mundo. Se encuentra formada por un grupo heterogéneo de plantas que consisten principalmente en hierbas con una gran variedad de órganos subterráneos de almacenamiento, como rizomas, bulbos, tubérculos y raíces tuberosas (Dahlgren y cols., 1985, Stevens, 2006). En las últimas dos décadas los estudios de ADN y los datos morfológicos (particularmente aquellos relacionados con la morfología reproductiva) sumados a los análisis filogenéticos, han permitido dividir a la familia en dos órdenes diferentes: *Asparagales* y *Liliales* (Pires y cols., 2006). Una de las subfamilias formadas, es la *Hyacinthaceae* que se encuentra incluida en el orden *Asparagales*, y se calcula que incluye aproximadamente 70 géneros y cerca de 1000 especies, que se encuentran principalmente distribuidas en Europa y las regiones extra tropicales de Asia y África, aunque también se les encuentra en el Continente Americano (Mwafongo y Magombo, 2010). Se caracterizan por presentar un elevado número de especies endémicas, localizadas en su mayoría en la región de Sudáfrica, el norte de Europa y América, un ejemplo de ello es *Hemiphylacus novogalicianus* (*H. novogalicianus*) (Pohl y cols., 2000).

2.1 Composición química de la subfamilia *Hyacinthaceae*.

Las plantas pertenecientes a la subfamilia *Hyacinthaceae* son plantas de hoja perenne con raíz bulbosa y crecimiento elevado a partir de un tallo cilíndrico muy estrecho. Una proporción relativamente pequeña de la familia *Hyacinthaceae* ha sido investigada fitoquímicamente. Los componentes que se han logrado identificar pueden ser clasificados en cuatro grupos: homoisoflavononas, esteroides, bufadienólidos y compuestos

considerados como de tipo miscelánea (Ácidos grasos, compuestos fenólicos, estilbenos, alcaloides) (Du Toit y cols., 2007). Las plantas incluidas en esta subfamilia desde hace mucho tiempo se utilizan en la medicina tradicional, comúnmente por tribus africanas como remedio para el tratamiento de muchas enfermedades: fiebre reumática, sífilis, resacas, entre otras (Mulholland y cols., 2013). Además las plantas pertenecientes a esta subfamilia contienen saponinas esteroidales y alcaloides de alta toxicidad, lo cual las relaciona con el envenenamiento de mamíferos (Flores-Morales y cols., 2014).

2.2 *Hemiphylacus novogalicianus*

H. novogalicianus, tiene como nombre común cebolleta, y su jerarquía taxonómica se presenta en la tabla 2 (I.B., 2011). *H. novogalicianus* es endémica de la localidad de San Pedro Piedra Gorda, Ciudad Cuauhtémoc, Zacatecas (Figura 9). Esta especie representa un problema para los ganaderos de la región, ya que la ingesta de la misma por parte de los animales (principalmente vacunos) ocasiona la muerte de éstos en un lapso de unas pocas horas. No se sabe qué es lo que ocasiona la muerte del ganado, y el problema se acrecienta porque actualmente no se dispone de reportes en los cuales se mencione la composición química de *H. novogalicianus* (Flores-Morales y cols., 2014).



Figura 9. Morfología de *H. novogalicianaus*. A) Planta en su ecosistema, B) Hojas, C) Tallo y D) Fruto y semilla.

Tabla 2. Jerarquía Taxonómica de <i>H. novogalicianus</i>	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Liliidae</i>
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Liliaceae</i>
Subfamilia	<i>Hyacinthaceae</i>
Género	<i>Hemiphylacus</i>
Especie	<i>novogalicianus</i>

Dentro del análisis fitoquímico que se ha realizado en los últimos años en *H. novogalicianus*, destaca el trabajo de Flores- Morales y colaboradores, quienes en el año 2014 realizaron el análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *H. novogalicianus*, como resultado en este análisis detectaron la presencia de lo que pudiesen ser compuestos de tipo indol y sus derivados, así como esteroides, ácidos grasos insaturados, y compuestos con grupos carbonilo, lo cual demuestra que *H. novogalicianus* tiene en su composición compuestos de naturaleza no polar, extraíbles en hexano. Por otro lado se ha realizado el estudio Químico-Biológico del extracto acetónico de las hojas de *H. novogalicianus* teniendo como objetivo determinar la Dosis Letal 50 (DL₅₀) en un modelo murino, en los resultados obtenidos en este trabajo la DL₅₀ en ratones fue de 259.5 ± 1.06 mg/ Kg, sin embargo aún no se encuentra la especie química responsable de dicho efecto (Flores- Morales y cols., 2016).

Respecto a la actividad biológica descrita para la subfamilia *Hyacinthaceae*, *Eucomis autumnalis* perteneciente a esta subfamilia, es endémica del sur de África, es conocida por sus propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas y antibacterianas, que son atribuidas a componentes tales como homoisoflavonas y flavonoides. *Eucomis autumnalis* también contiene algunos triterpenoides esteroideos que se sabe que son beneficiosos en la terapia de heridas. Sin embargo, el bulbo de dicha planta es altamente tóxico. *Eucomis* es uno de los géneros más comercializados en África dentro de la medicina tradicional, por tal motivo

es de vital importancia estudiar la actividad biológica que posee (Notten y Kirstenbosch, 2002; Bisi-Johnson y cols., 2011). En el año 2002 se reportó que *Eucomis autumnalis*, inhibe en un 88% a la ciclooxygenasa tipo 1, además de tener un efecto antibacteriano sobre *B. subtilis* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.2 mg/mL (Gaidamashvili y van Staden J, 2002). En investigaciones recientes se ha evaluado el efecto antibacteriano y citotóxico de *Eucomis autumnalis* sobre *E. coli* resistente a ampicilina y células de hepatoma humano (Huh-7 por sus siglas en inglés) respectivamente. La técnica de microdilución en placa fue la utilizada para determinar el efecto antibacteriano del extracto metanólico mostrando una CMI de 0.27 mg/mL, respecto al efecto citotóxico se obtuvo una Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de 7.8 mg/mL. (Bisi-Johnson y cols., 2011).

Ledebouria ovatifolia de igual manera perteneciente a esta subfamilia se ha utilizado para el tratamiento de gastroenteritis e influenza en el sur de África a pesar de presentar toxicidad en ovejas. En investigaciones recientes los extractos con metanol, acetato de etilo y diclorometano del bulbo de *Ledebouria ovatifolia* presentaron actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas teniendo una CMI en el rango de 0.8 – 12.5 mg/mL. Además mostraron actividad antihelmítica y antiinflamatoria, dicha actividad es atribuida a los compuestos de tipo homoisoflavona que posee (Mulholland y cols., 2013).

Leopoldia comosa es utilizada en el sur de Italia para el tratamiento de infecciones en la piel o mucosas, el principal agente causal de estas infecciones es *S.aureus*, por lo cual se han probado extractos de esta planta contra *S. aureus* resistente a meticilina, obteniendo CI₅₀ de 16 µg/mL. Las investigaciones químicas respecto los compuestos presentes en *L. comosa* muestran una alta cantidad de triterpenos a los cuales puede ser atribuible esta actividad antibacteriana (Quave y cols., 2008).

Continuando con la actividad biológica que presentan las plantas pertenecientes a la subfamilia *Hyacinthaceae* en el año 2013 se reportó que el bulbo de la planta *Muscari racemosum*, perteneciente a esta subfamilia posee actividad antioxidante, antimutagenica y anticancerígena. (Mulholland y cols., 2013).

Debido a la poca información que existe de *H. novogalicianus* y teniendo como antecedente la actividad antimicrobiana que poseen algunas plantas pertenecientes la subfamilia *Hyacinthaceae*, en este trabajo se propuso determinar el efecto antimicrobiano de extractos de *H. novogalicianus* en microorganismos de interés clínico.

3.0 Justificación

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde hace miles de años en diferentes partes del mundo para el tratamiento de múltiples enfermedades, dentro de las cuales destacan las enfermedades infecciosas.

En México la amplia variedad de especies vegetales ha permitido la presencia de especies endémicas, muchas de ellas han sido utilizadas dentro de la medicina tradicional; sin embargo carecen de estudios biológicos que corroboren el efecto terapéutico que se les atribuye. Las plantas medicinales son una buena fuente para la obtención de nuevos agentes antimicrobianos, lo cual resulta conveniente debido al aumento en la resistencia a ellos, en este contexto las plantas pertenecientes a la subfamilia *Hyacinthaceae* a la cual pertenece *H. novogalicianus*, se han caracterizado por poseer compuestos con propiedades antimicrobianas.

Por lo tanto, en este trabajo se llevará a cabo la evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de la planta *H. novogalicianus* sobre agentes patógenos de interés clínico, como bacterias y levaduras lo que resultará relevante por su contribución hacia la búsqueda de nuevos compuestos que pudieran ser utilizados de manera natural, para la síntesis o semi-síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana más eficaces y seguros para el ser humano.

4.0 Hipótesis

Los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus*, presentarán actividad biológica por medio de la inhibición del crecimiento de microorganismos de interés clínico.

5.0 Objetivo General

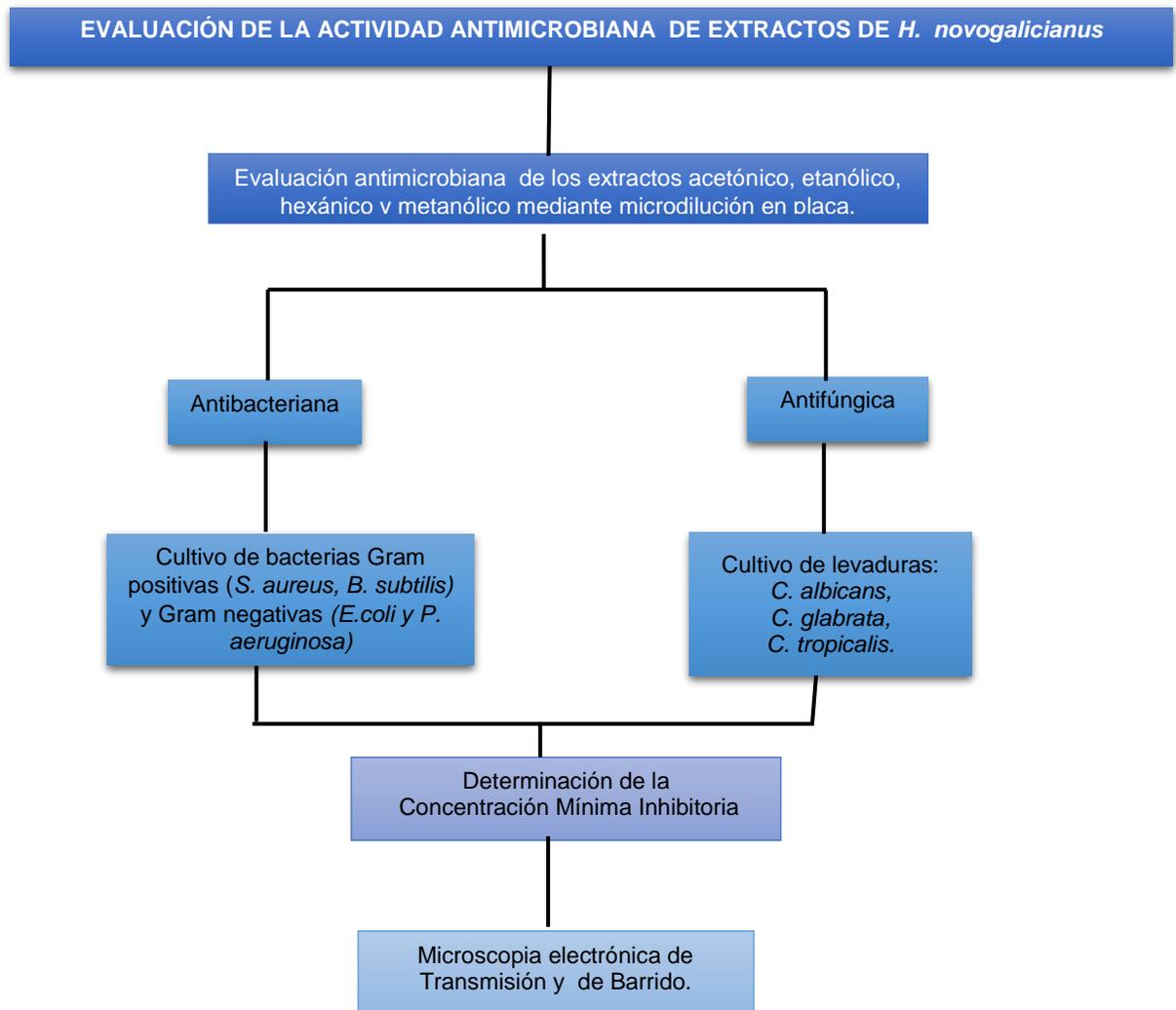
Evaluar el efecto antimicrobiano de cuatro extractos de *H. novogalicianus*, en bacterias y levaduras mediante la técnica de microdilución.

6.0 Objetivos Particulares

- Determinar la CMI de los extractos: acetónico etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus* en bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*) y Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*), mediante la técnica de microdilución en placa.
- Determinar la CMI de los extractos: acetónico etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus* en levaduras (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*), mediante la técnica de microdilución en placa.
- Analizar cualitativamente los cambios morfológicos y ultraestructurales de los extractos con actividad antimicrobiana sobre bacterias y levaduras, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) y Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

7.0 Metodología.

7.1 Estrategia experimental



7.1 Origen de los extractos vegetales: acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus*.

La obtención de los 4 extractos evaluados en el presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética de la Universidad Autónoma de Zacatecas, bajo la dirección de la Dra. Virginia Flores Morales.

La recolección de las muestras de *H. novogalicianus* se realizó en la localidad de San Pedro Piedra Gorda del municipio de Ciudad Cuauhtémoc, Zacatecas, el día 9 de Junio del 2013. Fue identificada con la colaboración de ganaderos locales, así como la participación del taxónomo Dr. en C. David Enríquez Enríquez. Las muestras que fueron recolectadas se secaron a temperatura ambiente, libre de humedad y a la sombra. Una vez seco y molido el material vegetal se sometió a un proceso de maceraciones sucesivas, con los siguientes disolventes: acetona, etanol, hexano y metanol, se cambió el disolvente usado por disolvente nuevo 3 veces: 24 h, 48 h y 72 h. Los extractos orgánicos obtenidos fueron concentrados con el uso de un rotaevaporador.

7.1.2 Soluciones Stock de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico.

Se prepararon soluciones stock de los cuatro extractos de *H. novogalicianus*, así como de los controles positivos Trimetoprima con sulfametoxazol para la evaluación antibacteriana y Fluconazol para la evaluación antifúngica en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 1 % y medio de cultivo líquido fresco. Las soluciones se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

7.2 Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano.

7.2.1. Cepas.

Se emplearon cepas de bacterias Gram positivas (*B. subtilis* y *S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) aisladas de hemocultivos del cepario del laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia U.A.E.M, las cuales se encontraban congeladas. Para su descongelación se sembraron 50 µL de cepa en caldo Soya Trypticaseina (TSB) y se incubaron por 24 h. Transcurrido este tiempo se sembraron en Agar Soya Trypticaseina (TSA) y se corroboró la pureza del cultivo.

7.2.2. Preparación del inóculo de las cepas bacterianas.

Se emplearon cultivos de 18 h de las bacterias en Medio de cultivo Müller Hinton (BDBixon), y se preparó una suspensión ajustada a 0.5 en la escala de Mc Farland (1×10^8 UFC/ml) (Neslihan y cols., 2013; Andrade y cols., 2011).

7.2.3. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus*.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante la técnica de microdilución en placa de 96 pozos (Corning Costar) de acuerdo con los lineamientos establecidos por el CLSI (m100, CLSI, 2017).

Se evaluaron tres concentraciones de los 4 extractos. En primer lugar, se adicionaron a cada pozo 100 μ L de medio de cultivo Müller Hinton (BDBixon). Posteriormente se adicionaron los extractos a evaluar y se hicieron diluciones seriadas dobles para obtener el rango de concentraciones a evaluar que fueron en primer lugar de 64 μ g/mL a 0.125 μ g/mL, posteriormente el rango fue de 1 mg/mL hasta 1.95 μ g/mL y el último rango de concentraciones evaluado fue de 20 mg/mL a 39 μ g/mL. Finalmente se adicionaron 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 en la escala de Mc Farland.

En cada ensayo se incluyó un grupo control sin tratamiento (suspensión bacteriana más medio de cultivo), un grupo control positivo de inhibición empleando Trimetoprima con sulfametoxazol y un blanco solo con medio de cultivo. Se incubaron las placas durante 48 h a 37°C. Posterior a ello, se determinó la absorbancia en un lector de placas (ELx808 BioTek) a una longitud de onda de 630 nm, y se determinó la CMI que es la concentración más baja a la cual se inhibió el crecimiento bacteriano, y fue reportada en mg/mL.

Cabe mencionar que también se incluyó un ensayo en el cual se simuló digestión a los 4 extractos para ser evaluados en las concentraciones de 1 mg/mL a 1.95 μ g/mL, para el cual se utilizó fluido gástrico simulado sin enzimas, en primer lugar se disolvió 1 g de cloruro de sodio (NaCl) en 300 mL de agua destilada, y se adicionaron 3.5 mL de ácido clorhídrico (HCl), posterior a ello se aforó a 500 mL con agua destilada y se guardó a 4°C para su uso posterior (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (F.E.U.M.) Métodos generales de análisis).

Para comenzar la evaluación de los extractos se utilizaron 2 mL de fluido gástrico simulado y se adicionaron a la solución patrón de los extractos. Se incubaron durante 1 h a 37 °C, transcurrido el tiempo se ajustó el pH de las soluciones a 7.4 y se procedió a preparar la solución de trabajo para comenzar con la evaluación de la actividad antibacteriana que se realizó de igual manera que los ensayos anteriores bajo la técnica de microdilución en placa de 96 pozos (Corning Costar) de acuerdo con los lineamientos establecidos por la CLSI m100 (CLSI, 2017).

7.2.4 Preparación de los extractos acuosos de hojas, flores y frutos de *H. novogalicianus*.

Se pesaron 150 g de hojas, flores y frutos de *H. novogalicianus*, y se adicionaron 300 mL de solución salina al 0.85%, se dejó reposar durante 30 min y posteriormente se trituraron y filtraron para retirar el exceso de planta, posterior a ello se centrifugo a 3500 rpm durante 15 min, se recuperó el sobrenadante, el cual se prefiltró con membranas 0.45 µm y finalmente con membranas 0.22 µm estériles. Los extractos se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

7.2.5 Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos acuosos de hojas, flores y frutos de *H. novogalicianus*.

Se utilizaron cultivos de 18 horas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis* ajustados a 0.5 en la escala de Mc Farland y se sembraron en placas de agar Mueller Hinton (BDBixon) por la técnica de doble placa. Los extractos acuosos fueron evaluados mediante la técnica de difusión en placa con ayuda de penicilindros, en cada uno de los penicilindros se colocaron 100 µL de los extractos acuosos para cada una de las bacterias. Por otro lado, se evaluaron los extractos acuosos por la técnica de difusión con ayuda de un sacabocados estéril con un diámetro de 6 mm, con el cual se perforo el agar y en el orificio se colocaron 100 µL de los extractos para cada una de las bacterias. Posteriormente se incubaron las placas a 37°C por 24 h y se determinó la presencia o ausencia de un halo de inhibición.

7.3 Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico.

7.3.1. Cepas.

Se emplearon cepas de levaduras: *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, aisladas de casos clínicos del cepario del laboratorio 9 de Microbiología y Parasitología de la Facultad de

Farmacia U.A.E.M, las cuales se encontraban congeladas. Para su descongelación se sembraron 50 µL de cada una de las cepas en caldo Dextrosa Sabouraud (DS) y se incubaron por 24 h. Transcurrido este tiempo se sembraron en Agar DS y se corroboró la pureza del cultivo.

7.3.2. Condiciones de cultivo de las levaduras.

Se utilizaron cultivos de 18 h de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* en Medio de cultivo RPMI- 1640 (BioWhittaker), pH 7.2. Se preparó una suspensión de levaduras ajustada a 0.5 en la escala de Mc Farland (Backes y cols., 2014).

7.3.3. Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus*.

La evaluación antifúngica de los 3 extractos se realizó bajo la técnica de microdilución en placa de 96 pozos (Corning Costar) bajo los requerimientos establecidos por el CLSI M27 (Cantón y Mazuelos, 2007, CLSI M27, 2012).

Se adicionaron 100 µL de medio de cultivo RPMI- 1640 (BioWhittaker) a cada pozo de la microplaca. Posteriormente se adicionaron los extractos a evaluar y se hicieron diluciones seriadas dobles para obtener el rango de concentraciones a las cuales se evaluaron dichos extractos (20 mg/mL a 0.039 mg/mL). Posteriormente se adicionaron 100 µL de la suspensión de cada una de las levaduras ajustada a 0.5 en la escala de Mc Farland. Cada ensayo incluyó un grupo control sin tratamiento (medio de cultivo más suspensión de levaduras), un grupo control positivo de inhibición en el cual se utilizó Fluconazol como fármaco estándar, así como un blanco de medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C. Posterior a ello se determinó la absorbancia en un lector de placas (ELx808 BioTek) a una longitud de onda de 490 nm, y se determinó la CMI, que fue reportada en mg/mL.

7.4 Análisis cualitativo del efecto de los extractos de *H. novogalicianus* con actividad antimicrobiana sobre los cambios morfológicos y ultraestructurales de bacterias y levaduras.

Para el análisis cualitativo del efecto de los extractos sobre la morfología ultraestructural de los microorganismos, se seleccionó el extracto que mostró mayor actividad antimicrobiana

en cada uno de los modelos evaluados con base a la CMI (mg/mL) obtenida en comparación con los fármacos control.

7.4.1 Preparación de las muestras para la Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) y Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

7.4.1.1 Bacterias y Levaduras.

Para la preparación de las bacterias se seleccionó una bacteria Gram positiva (*B. subtilis*) y una Gram negativa (*P. aeruginosa*) como representantes de cada uno de los grupos, en el caso de las levaduras de igual manera se seleccionó una de ellas (*C. albicans*) como representante de este grupo.

Se utilizaron una serie de tubos cónicos de 15 mL (Corning Costar) que contenían 3 mL medio de cultivo Müller Hinton (BDBixon) / RPMI- 1640 (BioWhittaker), al cual se adicionó 1 mL de inóculo de cultivos de 18 h que contenía bacterias / levaduras; posteriormente se adicionó 1 mL de las soluciones de extractos evaluados empleando las siguientes concentraciones: 1 CMI, 2 CMI y 4 CMI, y se incubaron a 37°C durante 48 h. Se incluyó un control de crecimiento sin tratamiento, así como un control con solvente DMSO 1 % y un control positivo con Trimetoprima con sulfametoxazol y Fluconazol. Al transcurrir el tiempo de incubación, los cultivos se agitaron suavemente y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Posterior a ello las bacterias o las levaduras se lavaron con PBS (pH 7.4) estéril, y se fijaron con Glutaraldehído al 2.5 % por 3 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron nuevamente a 3000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados más con PBS y los microorganismos se conservaron en la misma solución a 4°C hasta su uso posterior.

7.4.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

Los microorganismos previamente fijados, se lavaron 3 veces por 5 min con el mismo amortiguador. Transcurrido ese tiempo las muestras se post-fijaron con tetróxido de osmio (OsO_4) en agua en porciones 1:1 por 2 h a 4°C. Las muestras se lavaron 10 veces con PBS, se deshidrataron con un gradiente de etanol del 30 al 90% por 10 min realizando un cambio, y etanol al 100% con tres cambios de 10 min.

Posteriormente, se les aplicó un tratamiento de transición con óxido de propileno con dos cambios de 20 min; un periodo de pre-inclusión con resina Epon 812- óxido de propileno

1:2, 1:1 y 3:1, con un cambio de 1 h. La inclusión se realizó con resina al 100% con dos cambios de 4 h y la polimerización se realizó a 60°C por 72 h. Los cortes de 70 nm de grosor se realizaron en un ultramicrotomo con una cuchilla de diamante y se colocaron en rejillas de cobre de malla 200 sin recubrimiento. Se contrastó con acetato de uranilo al 1% por 5 min y citrato de plomo Reynolds durante 5 min. Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión marca Jeol modelo 1010 con voltaje de aceleración de 60 Kv.

7.4.3. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Los microorganismos previamente fijados, se lavaron 2 veces por 5 min con el mismo amortiguador. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en un gradiente de etanol del 30 al 90% por 10 min realizando un cambio, y etanol al 100% con tres cambios de 10 min. Las muestras deshidratadas se secaron con CO₂ al punto crítico, en una secadora marca Tousimi. Posteriormente las muestras se montaron en los porta especímenes de aluminio y se cubrieron con oro coloidal en una ionizadora marca Denton Vacuum. Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) marca Jeol JSM-5800LV, con un voltaje de aceleración de 15 Kv.

8.0 Resultados.

8.1 Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extracto acuosos de hojas, flores y frutos.

En la evaluación del efecto antibacteriano mediante la técnica de difusión en placa con ayuda de penicilindros de los extractos acuosos de hojas, flores y frutos de *H. novogalicianus* en bacterias no se logró observar ningún halo de inhibición, debido a que el extracto no difundió sobre el agar de la manera adecuada en ninguna de las 4 bacterias evaluadas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*), en la figura 9 se puede observar que después del tiempo de incubación el extracto aún permanece dentro del penicilindro en la placa de agar con *E. coli* y por tal motivo no pudo observarse ningún halo de inhibición en caso de que hubiera actividad antimicrobiana.

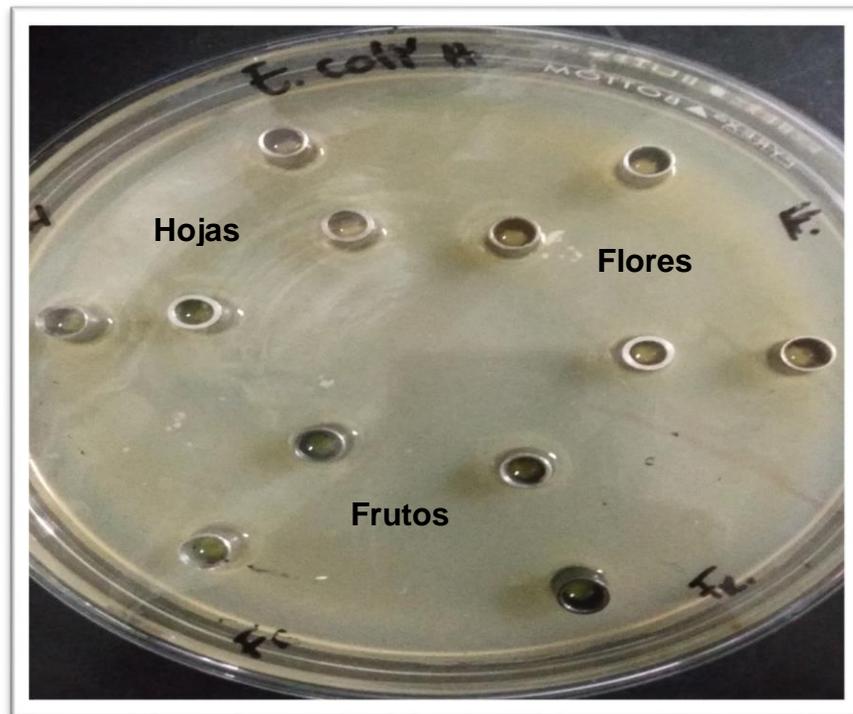


Figura 10. Evaluación en placa de los extractos acuosos de *H. novogalicianus* en *E. coli*. Los extractos de frutos, flores y hojas no presentaron actividad antibacteriana.

Respecto a la evaluación del efecto antibacteriano mediante la técnica de difusión en placa con ayuda de un sacabocados estéril de los extractos acuosos de hojas, flores y frutos de *H. novogalicianus* en bacterias los resultados fueron los siguientes:

- *P. aeruginosa*: Transcurrido el tiempo de incubación en la placa de agar no se logró observar ningún halo de inhibición (Figura 10), para ninguno de los 3 extractos.
- *E. coli*: Posterior al tiempo de incubación en la placa de agar no se logró observar ningún halo de inhibición (Figura 11), en los 3 extractos.
- *B. subtilis*: Transcurrido el tiempo de incubación de los extractos en la placa de agar, se logró observar un halo de inhibición de los extractos de flores y hojas sin embargo del extracto de frutos no se observó ningún halo (Figura 12).
- *S. aureus*: Al pasar el tiempo de incubación únicamente se logró observar un halo de inhibición para el extracto acuosos de hojas sobre esta bacteria (Figura 13).

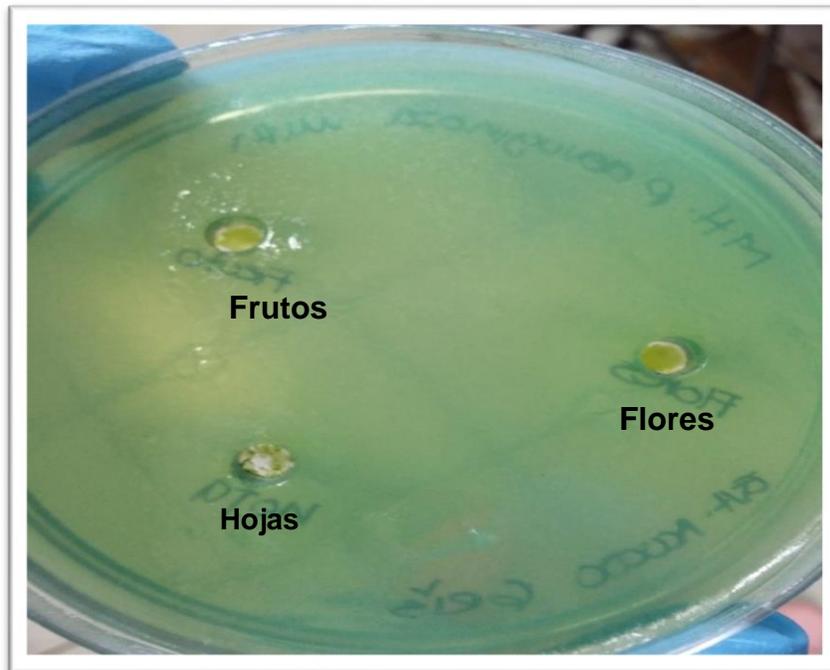


Figura 11. Evaluación en placa de los extractos acuosos de *H. novogalicianus* en *P. aeruginosa*. Los extractos de frutos, flores y hojas no presentaron actividad antibacteriana.

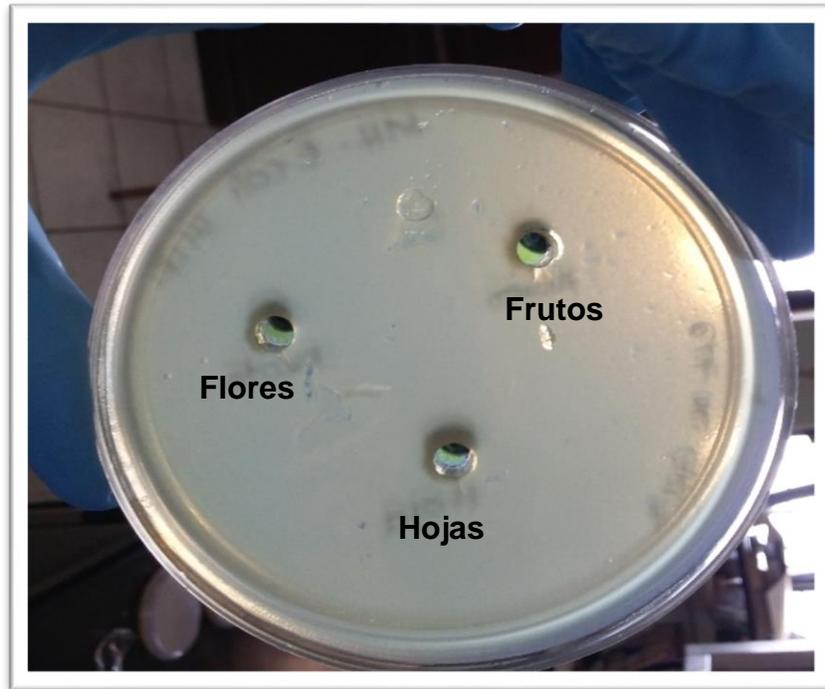


Figura 12. Evaluación en placa de los extractos acuosos de *H. novogalicianus* en *E. coli*, los extractos de frutos, flores y hojas no presentaron actividad antibacteriana.

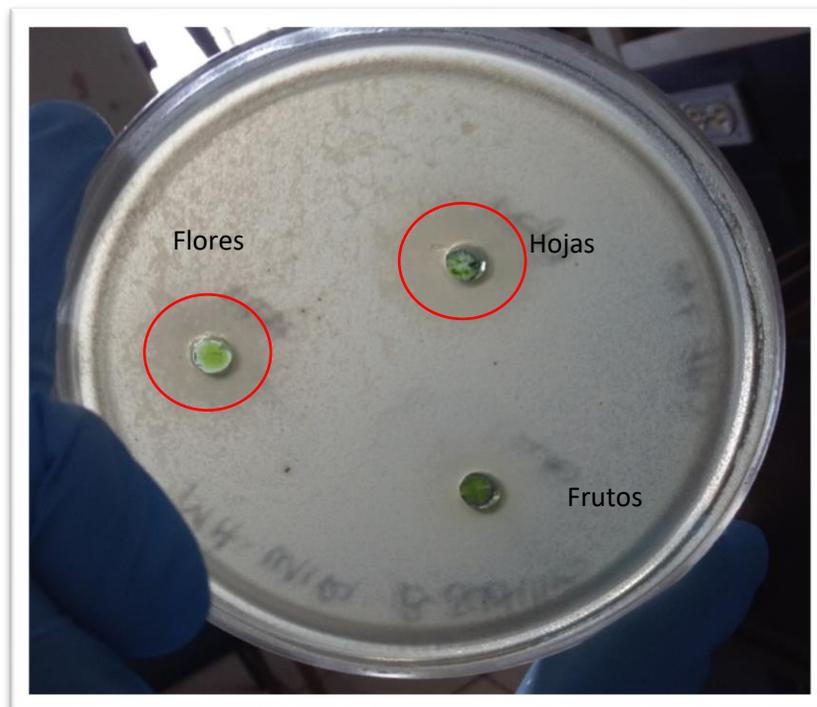


Figura 13. Evaluación en placa de los extractos acuosos de *H. novogalicianus* en *B. subtilis*. Los extractos de flores y hojas presentaron actividad antibacteriana, mientras que el extracto de frutos no presentó actividad antibacteriana.

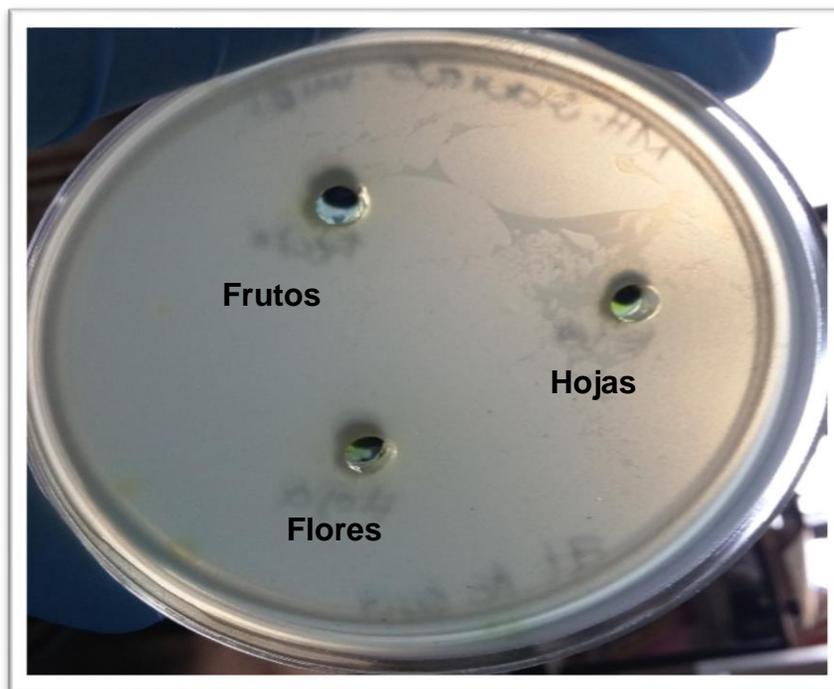


Figura 14. Evaluación en placa de los extractos acuosos de *H. novogalicianus* en *S.aureus*. Los extractos de frutos y flores no presentaron actividad antibacteriana, sin embargo el extracto de hojas sí mostró actividad antibacteriana.

8.1 Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico.

Respecto a la evaluación del efecto antibacteriano de los 4 extractos (acetónico, etanólico, hexánico y metanólico) de *H. novogalicianus*, en primer lugar, se realizó la evaluación de estos extractos en el rango 64 $\mu\text{g/mL}$ a 0.125 $\mu\text{g/mL}$. Estos extractos no presentaron efecto antibacteriano en comparación con el fármaco control positivo de inhibición utilizado Trimetoprima con sulfametoxazol (Tabla 3). Posterior a ello se realizó la evaluación de estos extractos en un rango de 1 mg/mL hasta 1.95 $\mu\text{g/mL}$ y en este rango de concentraciones los extractos tampoco mostraron efecto antibacteriano en comparación con el fármaco control positivo de inhibición Trimetoprima con sulfametoxazol (Tabla 4).

Respecto a la evaluación antibacteriana de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus*, con digestión simulada el rango de concentración fue de

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*.

1 mg/mL hasta 1.95 µg/mL, en ninguna concentración y en ninguna cepa bacteriana empleada se presentó actividad antibacteriana en comparación con el fármaco control positivo de inhibición empleado Trimetoprima con sulfametoxazol (tabla 5).

Tabla 3. Evaluación del efecto antibacteriano de Extractos de *H. novogalicianus* 64 µg/mL - 0.125 µg/mL.

Bacteria	Extracto acetónico CMI (µg/mL)	Extracto etanólico CMI (µg/mL)	Extracto hexánico CMI (µg/mL)	Extracto metanólico CMI (µg/mL)	Trimetoprima con sulfametoxazol CMI (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	8 ± 0.57
<i>B. subtilis</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	1 ± 0.07
<i>E. coli</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	32 ± 2.1
<i>P. aeruginosa</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	32 ± 0.89

Tabla 4. Evaluación del efecto antibacteriano de Extractos de *H. novogalicianus* 1 mg/mL - 1.95 µg/mL

Bacteria	Extracto acetónico	Extracto etanólico	Extracto hexánico	Extracto metanólico	Trimetoprima con sulfametoxazol CMI (µg/mL)
	CMI (mg/mL)				
<i>S. aureus</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	8 ± 0.32
<i>B. subtilis</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	1 ± 0.19
<i>E. coli</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	32 ± 0.96
<i>P. aeruginosa</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	32 ± 0.62

Tabla 5. Evaluación del efecto antibacteriano de Extractos de *H. novogalicianus* 1 mg/mL - 1.95 µg/mL con digestión simulada.

Bacteria	Extracto acetónico CMI (mg/mL)	Extracto etanólico CMI (mg/mL)	Extracto hexánico CMI (mg/mL)	Extracto metanólico CMI (mg/mL)	Trimetoprima con sulfametoxazol CMI (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	8 ± 3.11
<i>B. subtilis</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	1 ± 0.43
<i>E. coli</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	32 ± 0.98
<i>P. aeruginosa</i>	S.E	S.E	S.E	S.E	32 ± 0.47

Cada valor corresponde al promedio de tres ensayos independientes por duplicado ± D.E.; S.E = Sin efecto antibacteriano a las concentraciones evaluadas.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*.

Finalmente en la evaluación del efecto antibacteriano de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus* en el rangos de concentración de 20 mg/mL a 0.039 mg/mL contra *B. subtilis*, el extracto acetónico presento una CMI de 20 mg/mL, mientras que el extracto etanólico presento una CMI de 10 mg/mL, el extracto hexánico de 5 mg/mL y el extracto metanólico tuvo una CMI de 20 mg/mL, mientras que el fármaco control empleado Trimetoprima con sulfametoxazol presento una CMI de 4 µg/mL. Respecto a la evaluación antibacteriana contra *P. aeruginosa*, posterior al tiempo de incubación el extracto hexánico presentó una CMI de 20 mg/mL, mientras que los extractos acetónico, etanólico y metanólico no presentaron actividad antibacteriana en este rango de concentración evaluado, por otro lado el fármaco control positivo de inhibición Trimetoprima con sulfametoxazol tuvo una CMI de 64 µg/mL. En la evaluación antibacteriana contra *E. coli*, los extractos acetónico, etanólico y metanólico no presentaron efecto antibacteriano, sin embargo, el extracto hexánico presento una CMI de 20 mg/mL, por otro lado, Trimetoprima con sulfametoxazol utilizado como fármaco control positivo de inhibición tuvo una CMI de 32 µg/mL. Por su parte en la evaluación antibacteriana contra *S. aureus*, ninguno de los extractos mostro efecto antibacteriano a las concentraciones evaluadas, mientras que Trimetoprima con sulfametoxazol presento una CMI de 0.125 µg/mL, los resultados se resumen en la tabla 6, cabe señalar que los resultados presentados son el reflejo de 3 ensayos independientes por duplicado.

Tabla 6. Evaluación del efecto antibacteriano de Extractos de *H. novogalicianus* 20 mg/mL a 0.039 mg/mL

Bacteria	Extracto acetónico CMI (mg/mL)	Extracto etanólico CMI (mg/mL)	Extracto hexánico CMI (mg/mL)	Extracto metanólico CMI (mg/mL)	Trimetoprim con sulfametoxazol CMI (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	S.E	SE	S.E	S.E	0.125 ± 0.14
<i>B. subtilis</i>	20 ± 0.98	10 ± 2.74	5 ± 0.59	20 ± 0.24	4 ± 1.89
<i>E. coli</i>	S.E	S.E	20 ± 0.15	S. E	32 ± 1.27
<i>P. aeruginosa</i>	S.E	S.E	20 ± 3.19	S.E	64 ± 1.17

Cada valor corresponde al promedio de tres ensayos independientes por duplicado ± D.E.; S.E = Sin efecto antibacteriano a las concentraciones evaluadas.

8.2 Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico.

En relación con la actividad antifúngica de los extractos acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus*, se realizaron 3 ensayos independientes por duplicado, los extractos fueron evaluados en un rango de concentración de 20 mg/mL a 0.039 mg/mL. El extracto acetónico, etanólico y metanólico no presentaron actividad antifúngica en el rango de concentración evaluados; por otro lado, el extracto hexánico mostró efecto antifúngico sobre las levaduras evaluadas con una CMI de 20 mg/mL para *C. albicans* y *C. tropicalis*, mientras que para *C. glabrata* mostró una CMI de 10 mg/mL. El fármaco estándar para este ensayo fue Fluconazol, que tuvo una CMI de 64 µg/mL para *C. albicans* y *C. tropicalis*, mientras que para *C. glabrata* presentó una CMI de 32 µg/mL, dichos resultados se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Evaluación del efecto antifúngico de Extractos de *H. novogalicianus* 20 mg/mL a 39 µg/mL

Levadura	Extracto acetónico CMI (mg/mL)	Extracto etanólico CMI (mg/mL)	Extracto hexánico CMI (mg/mL)	Extracto metanólico CMI (mg/mL)	Fluconazol CMI (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	S.E	S.E	20 ± 0.11	S.E	64 ± 0.68
<i>C. glabrata</i>	S.E	S.E	10 ± 0.20	S.E	32 ± 0.34
<i>C. tropicalis</i>	S.E	S.E	20 ± 0.88	S. E	64 ± 0.59

Cada valor corresponde al promedio de tres ensayos independientes por duplicado ± D.E.; S.E = Sin efecto antifúngico a las concentraciones evaluadas.

8.4 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

La microscopia Electrónica de Barrido y Transmisión, son técnicas que nos ofrecen información morfológica y ultraestructural de los efectos que pueden ser producidos en una célula después de realizar determinado experimento. En el presente trabajo se emplearon ambas técnicas para observar los cambios morfológicos y ultraestructurales asociados al efecto antimicrobiano de del extracto hexánico de *H. novogalicianus* sobre bacterias (*B. subtilis* y *P. aeruginosa*) y levaduras (*C. albicans*).

8.4.1 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Con la finalidad de obtener una mayor comprensión del efecto antimicrobiano del extracto hexánico en la topografía de bacterias y levaduras, se realizó un estudio microscópico mediante MEB de los microorganismos tratados con el extracto a 1 CMI, 2 CMI y 4 CMI, así como del fármaco control positivo de inhibición, control de crecimiento y control disolvente.

En las micrografías electrónicas de barrido de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* procedentes del control de crecimiento, control disolvente DMSO 1 %, Control positivo de inhibición Trimetoprima con Sulfametoxazol / Fluconazol, así como de las diferentes concentraciones del extracto hexánico, en las figuras 14 y 15 podemos observar que no hay alteraciones aparentes en la topografía de los microorganismos, los resultados pueden ser debidos a la resolución que posee el microscopio electrónico de barrido.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*.

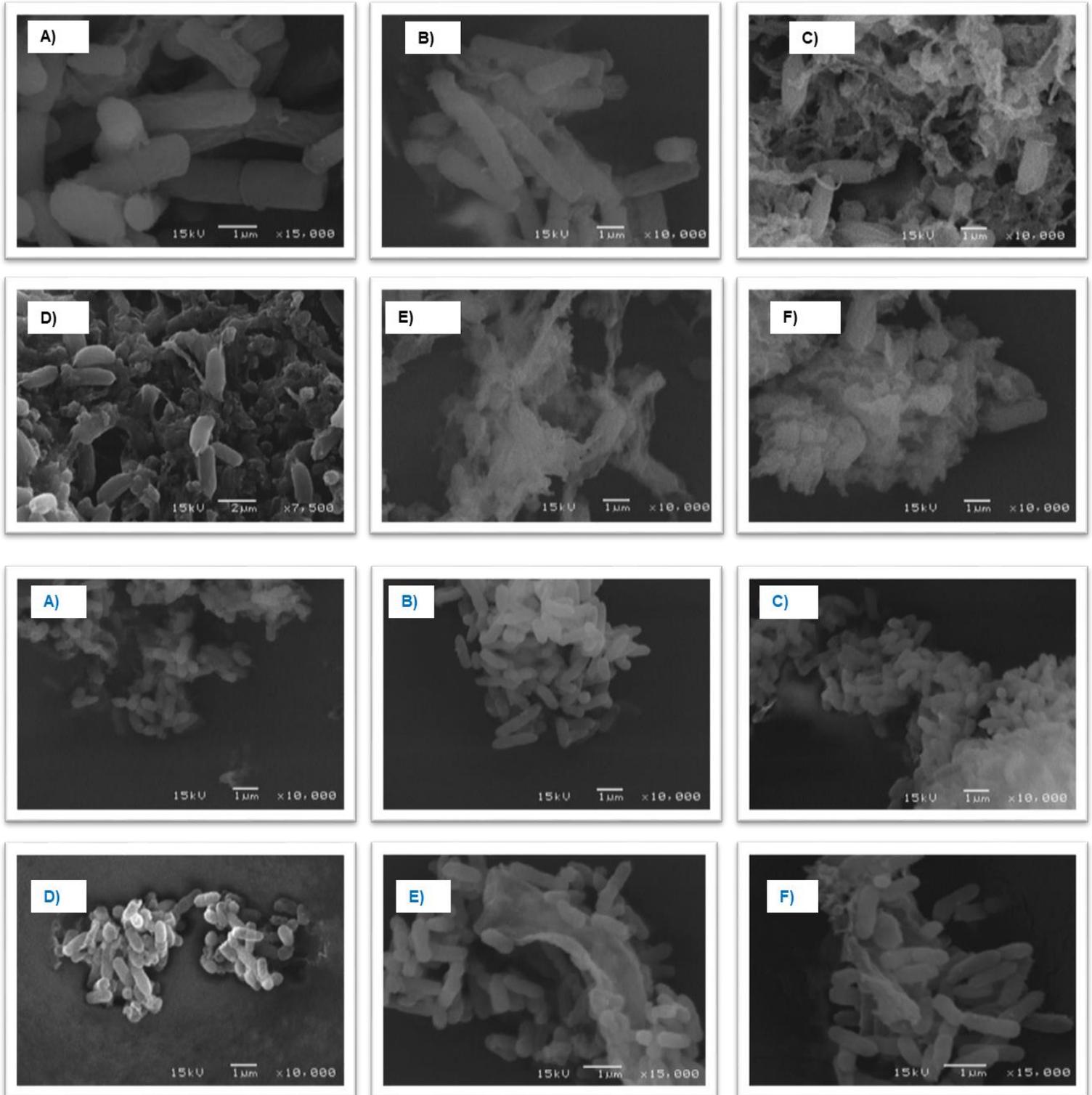


Figura 15. Microscopia electrónica de Barrido en Bacterias; *B. subtilis* y *P. aeruginosa*.

A) Control de crecimiento; **B)** Control Solvente DMSO 1%; **C)** Control positivo de inhibición Trimetoprima con sulfametoxazol 1 CMI; **D)** Extracto hexánico 1 CMI; **E)** Extracto hexánico 2 CMI; **F)** Extracto hexánico 4 CMI.

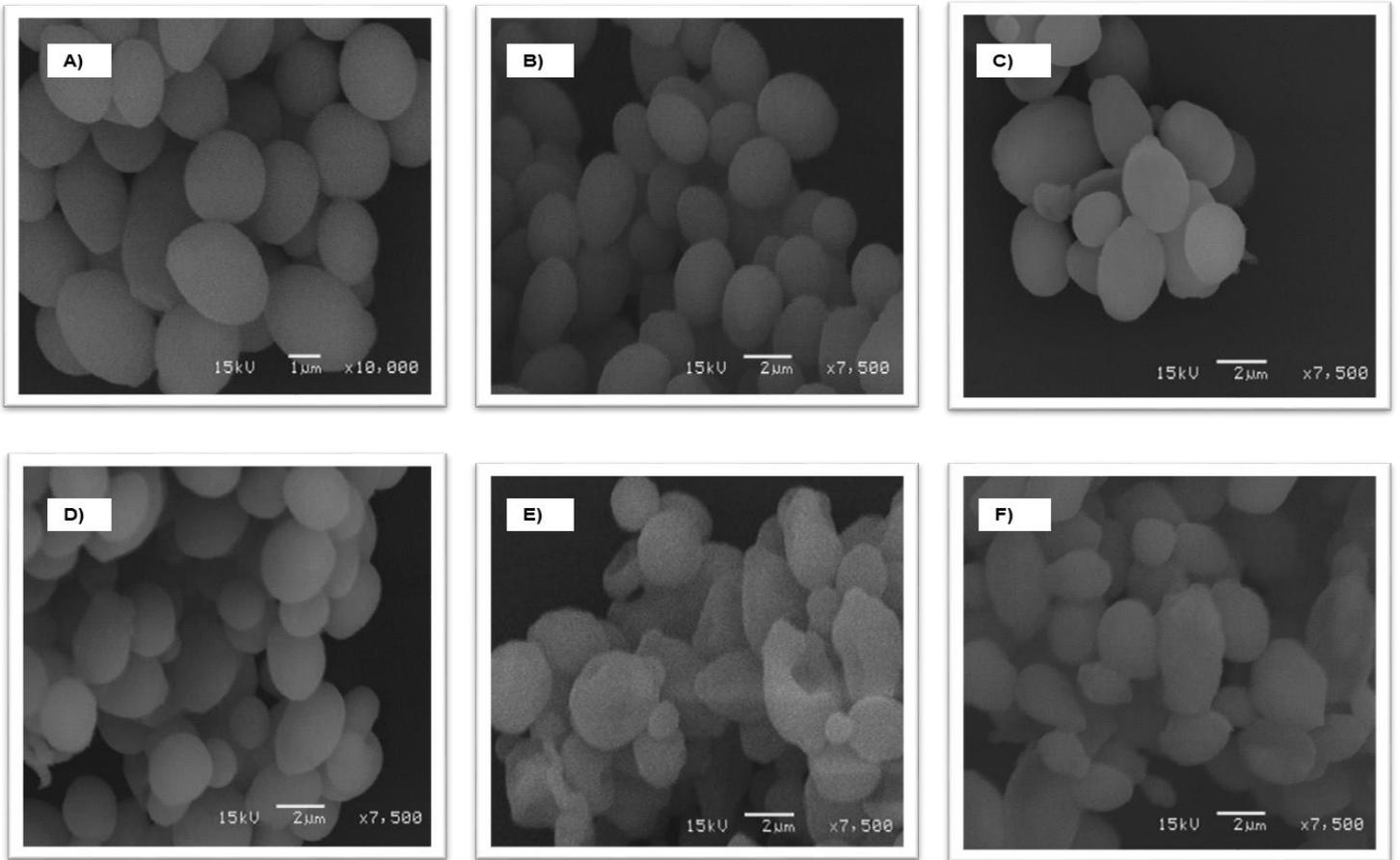


Figura 16. Microscopia electrónica de Barrido en *C. albicans*.

A) Control de crecimiento; **B)** Control Solvente DMSO 1%; **C)** Control positivo de inhibición Fluconazol 1MIC; **D)** Extracto hexánico 1 CMI; **E)** Extracto hexánico 2 CMI; **F)** Extracto hexánico 4 CMI.

8.4.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

8.4.2.1 Bacterias.

Para la MET se utilizó *B. subtilis* y *P. aeruginosa* como bacterias representativas, las concentraciones empleadas del extracto hexánico se basaron en los valores de CMI obtenidos, en el orden de mg/ mL, de acuerdo a lo establecido en el CLSI se tomaron los valores de 1, 2 y 4 veces la CMI, por otro lado, se incluyó un control de crecimiento, un control con el disolvente utilizado DMSO 1 % y Trimetoprima con sulfametoxazol a 1 CMI.

Respecto al análisis ultraestructural de *B. subtilis* provenientes del control de crecimiento y control de disolvente DMSO 1 % podemos observar la forma bacilar característica de esta bacteria sin alteraciones, así como la integridad del citoplasma, membrana y pared celular; sin embargo en las micrografías provenientes del control positivo Trimetoprima con sulfametoxazol, se logran apreciar alteraciones del citoplasma y del material genético, así como una lesión en la pared y membrana celular, por otro lado se puede observar una cantidad considerable de endoesporas y varios restos celulares provenientes de bacilos que ya han sido destruidos en su totalidad. Respecto al análisis ultraestructural de cultivos expuestos al extracto hexánico a 1 CMI se observó una gran cantidad de endoesporas, así como un alto contenido de restos celulares provenientes de la destrucción bacteriana. En las micrografías de los cultivos expuestos a 2 CMI se observa una clara destrucción de las células, los bacilos han perdido su forma característica y disminuyó la cantidad de endoesporas presentes, de igual manera en cultivos expuestos a 4 veces la CMI se logra observar una pérdida del contenido intracelular, no se observa la formación de endoesporas (Figura 16).

En cuanto al análisis ultraestructural de *P. aeruginosa*, en las micrografías pertenecientes al control de crecimiento y control disolvente DMSO 1% se observa la forma bacilar característica de esta bacteria, así como la integridad del citoplasma, membrana y pared celular, por otro lado, en las micrografías de la bacteria expuesta a 1 CMI del extracto hexánico se observa la destrucción el daño en la pared y membrana celular; así como alteraciones en el citoplasma y material genético. En las micrografías pertenecientes a cultivos expuestos a 2 CMI se observa que las células han perdido su forma bacilar, se observa un daño en la membrana y pared celular; así como una clara condensación del citoplasma, de igual manera en los cultivos expuestos a 4 CMI del extracto hexánico se observa una deformación en la morfología celular, así como una clara alteración del citoplasma (Figura 17).

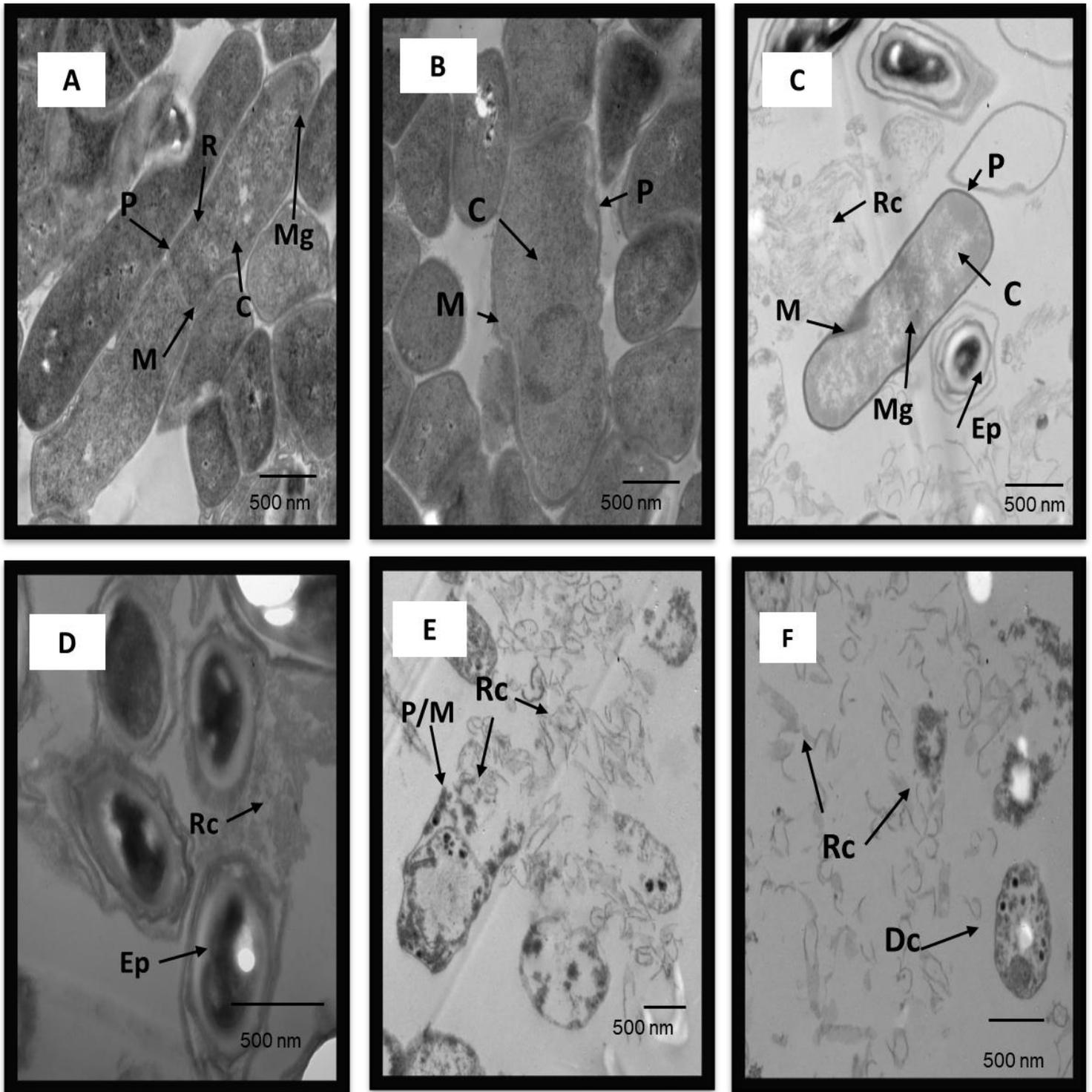


Figura 17. Microscopía Electrónica de Transmisión de *B. subtilis*.

A) Control de crecimiento; B) Control disolvente DMSO 1%; C) Control positivo de inhibición Trimetoprima con sulfametoxazol 1CMI; D) Extracto hexánico 1CMI; E) Extracto hexánico 2 CMI; C) Extracto hexánico 4 CMI.

*Membrana Celular (M); Citoplasma (C); Ribosoma (R), Pared Celular (P); Material genético (Mg); Endoesporas (Ep); Degradación celular (Dc); Restos celulares (Rc).

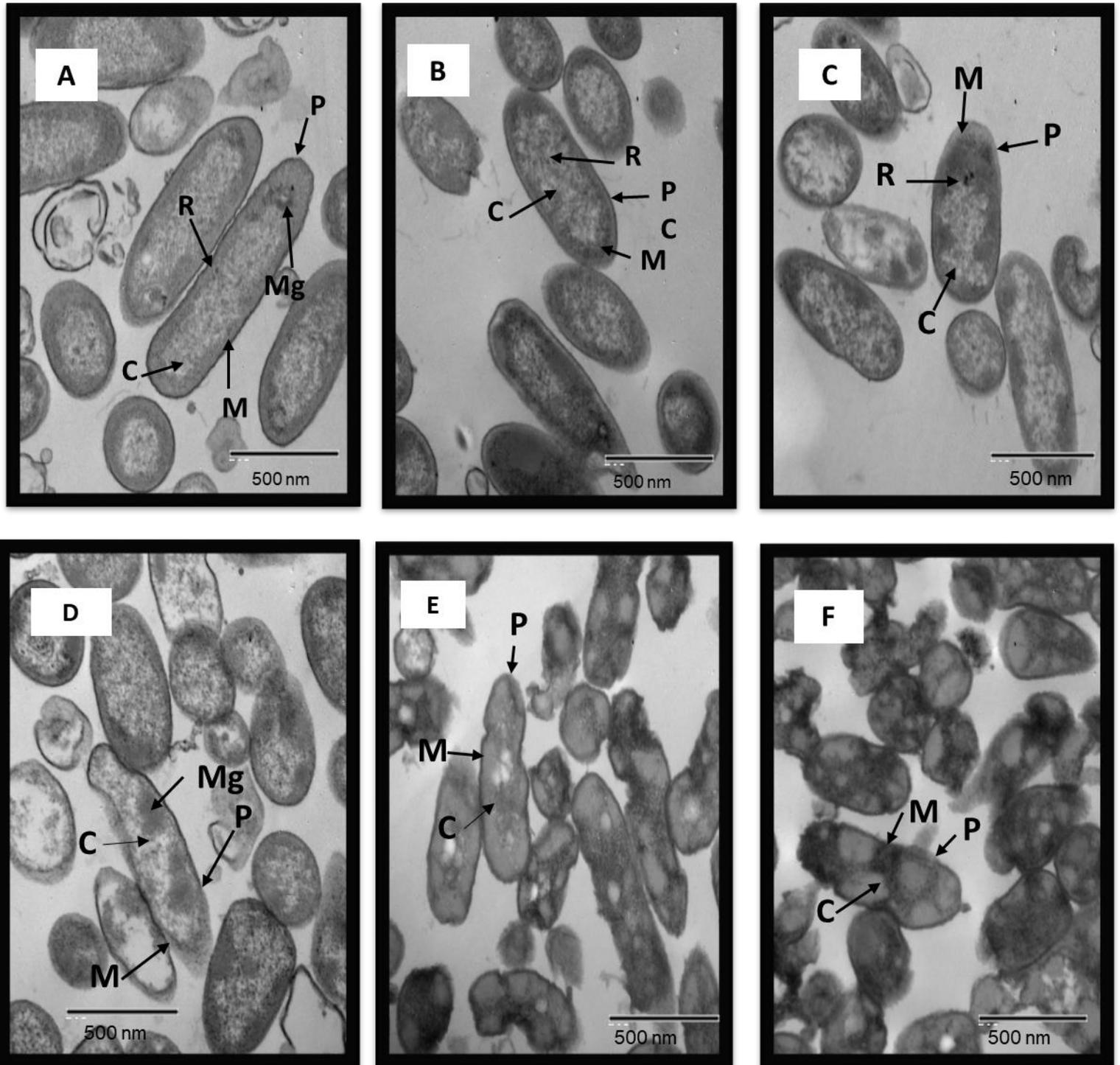


Figura 18. Microscopia Electrónica de Transmisión de *P. aeruginosa*.

A) Control de crecimiento; B) Control disolvente DMSO 1%; C) Control positivo de inhibición Trimetoprima con sulfametoxazol 1CMI; D) Extracto hexánico 1CMI; E) Extracto hexánico 2 CMI; F) Extracto hexánico 4 CMI.

*Membrana Celular (M); Citoplasma (C); Ribosoma (R), Pared Celular (P); Material genético (Mg).

8.3.1.2. Levaduras.

Para la MET se utilizó *C. albicans* como levadura representativa, al igual que en la MEB para bacterias las concentraciones empleadas del extracto hexánico se basaron en los valores de CMI obtenidos, en el orden de mg/ mL, de acuerdo con lo establecido en el CLSI se tomaron los valores de 1, 2 y 4 veces la CMI, por otro lado, se incluyó un control de crecimiento, un control con el disolvente utilizado DMSO 1% y Fluconazol como control positivo de inhibición a 1 vez la CMI.

El análisis ultraestructural de la levadura que proveniente del control de crecimiento mostró morfología característica sin alteraciones en el núcleo, con presencia de cromatina periférica, se observa perfectamente la membrana nuclear, así como mitocondrias en el citoplasma, se puede observar la integridad de la membrana y pared celular (Figura 18).

En las micrografías provenientes del control disolvente DMSO 1%, se puede observar nuevamente la morfología característica de la levadura, sin alteraciones en el núcleo, se logran apreciar un gran número de mitocondrias en el citoplasma, así como una vacuola que abarca gran parte de él. Por otro lado, se observa la preservación de la membrana y pared celular (Figura 18).

Con el Fluconazol logramos observar una desnaturalización del núcleo, así como una mayor cantidad de cuerpos intravacuolares, por otro lado, se observa una ligera irregularidad en la membrana celular (Figura 18).

Respecto al análisis ultraestructural de la levadura proveniente de cultivos expuestos al extracto hexánico se observó a una CMI, la integridad de la membrana y pared celular, sin embargo hay una elevada cantidad de cuerpos intravacuolares, así como una ligera degradación de las mitocondrias y del núcleo. Con la exposición a dos CMI del extracto se observan alteraciones en el citoplasma, mitocondrias y núcleo, así como una deformación en la membrana y pared celular. Respecto a la exposición a 4 veces la CMI, es evidente el daño que sufre el citoplasma, mitocondrias y núcleo, así como la ruptura de la membrana celular y la consecuente liberación de componentes intracelulares (Figura 18).

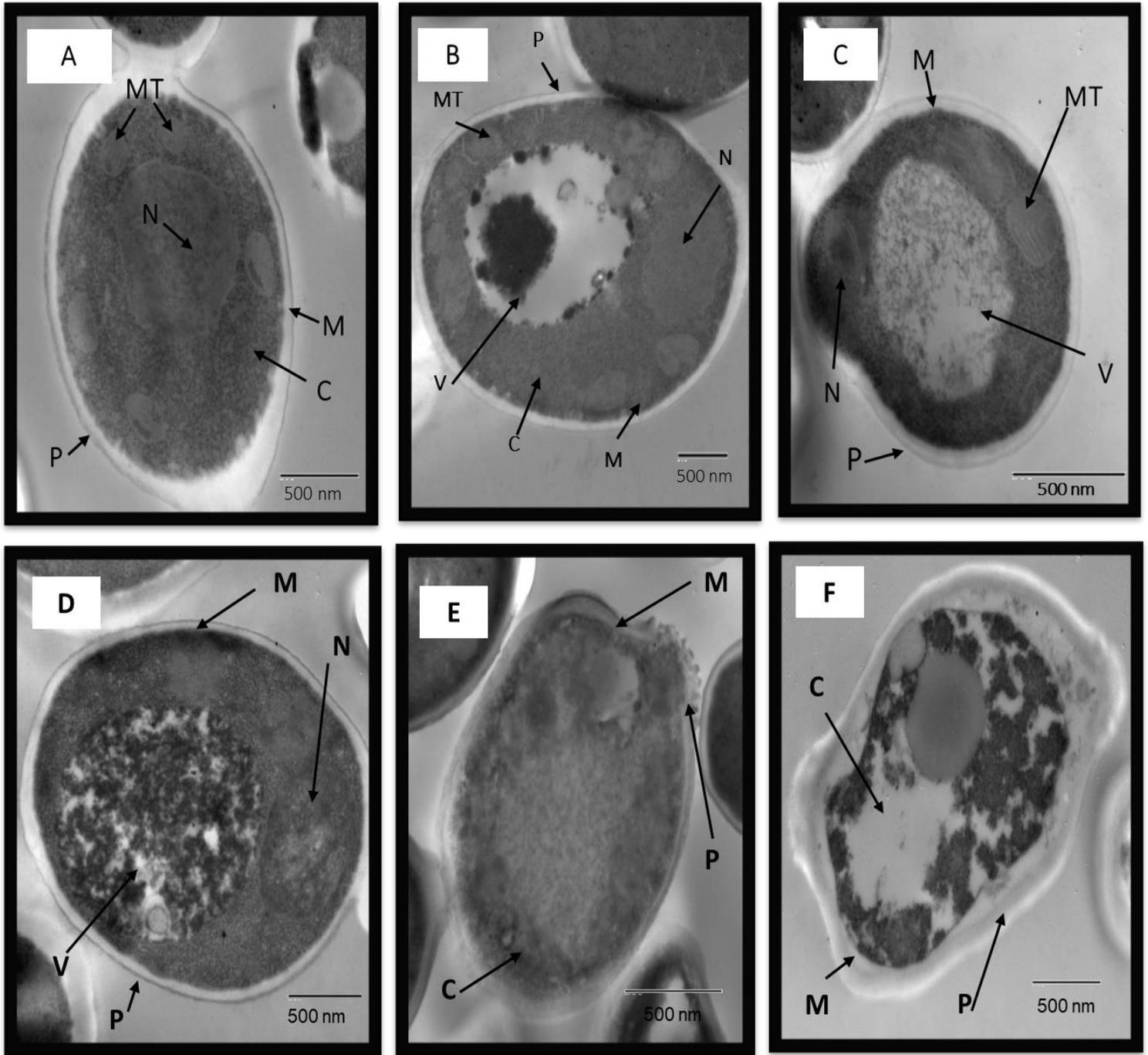


Figura 19. Microscopía Electrónica de Transmisión de *C. albicans*.

A) Control de crecimiento; B) Control disolvente DMSO 1%; C) Control positivo de inhibición Fluconazol 1CMI; D) Extracto hexánico 1CMI; E) Extracto hexánico 2 CMI; C) Extracto hexánico 4 CMI.

*Membrana Celular (M); Citoplasma (C); Pared Celular (P); Mitocondria (MT), Núcleo (N); Vacuola (V).

9.0 Discusión.

Desde hace muchos años se han utilizado los productos naturales en el tratamiento y cura de enfermedades, no solo en México si no en el mundo entero. La importancia de los productos naturales en la industria farmacéutica radica en que pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, o como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico (Gutiérrez y Estévez, 2009).

En la literatura se reporta que platas pertenecientes a la subfamilia *Hyacinthaceae* tal es el caso de *H. novogalicianus*, se caracterizan por contener compuestos que poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana entre otras (Notten y Kirstenbosch, 2002; Gaidamashvili y Van Staden J, 2002; Bisi-Johnson y cols., 2011; Mulholland y cols., 2013; Flores-Morales y cols., 2014).

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de sustancias sintéticas y productos naturales, los principales métodos de evaluación son los métodos de difusión y dilución. Ambos métodos han sido utilizados por varios años, en los métodos de difusión se evalúa la actividad antibacteriana de una manera cualitativa, mientras que en los métodos de dilución se hace de una manera cuantitativa (Murphy, 1999; Ramírez y Castaño, 2009).

Con base a lo anteriormente expuesto en este trabajo se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica de 4 extractos orgánicos (acetónico, etanólico, hexánico y metanólico) de *H. novogalicianus*.

En primer lugar, se determinó la actividad antibacteriana sobre: *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, en un rango de concentración de 64 µg/mL a 0.125 µg/mL, ninguno de los 4 extractos presento actividad antibacteriana. Los resultados obtenidos en este ensayo fueron comparados con el control positivo de inhibición Trimetoprima con sulfametoxazol, para el caso de *E.coli* y *P. aeruginosa* presentaron una CMI de 32 µg/mL, mientras que para para *B. subtilis* y *S. aureus* fue de 1 µg/mL y 8 µg/mL respectivamente (Tabla 3.), estos resultados pueden ser atribuibles a que las concentraciones a las cuales fueron evaluados los extractos eran relativamente bajas si hablamos de productos naturales, por lo cual fue necesario aumentar la concentración para saber si los extractos mostraban efecto antibacteriano a una concentración superior, ya que lo reportado en la literatura demuestra

que las concentraciones utilizadas para la evaluación de los productos naturales son muy variadas van desde los microgramos hasta miligramos.

De Bellis en 2013 evaluó la actividad antibacteriana de extractos y aceites vegetales de diferentes plantas de la región de Uruguay en un rango de concentraciones de 10 a 0.125 mg/mL, de igual manera Mojica y cols., en 2015 evaluaron la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *E. faecalis* resistente a vancomicina en el cual el rango de concentraciones de los extractos vegetales fue de 10 mg/mL a 0.156 mg/mL. Por otro lado, Abadie y cols., en 2014 aumentaron el rango de concentraciones de los extractos de *Alchornea triplinervia*, *Annona muricata*, *Caraipa grandifolia*, y *Brunfelsia grandiflora* evaluados contra cepas intrahospitalarias hasta 250 mg/mL. Vega y cols., por el contrario, evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos de *Leucophyllum frutescens* contra *S.aureus* de aislados clínicos en un rango de concentraciones de 1 mg/mL a 250 mg/mL, teniendo como resultados la inhibición de las cepas de *S. aureus*. Por esta razón se procedió a aumentar la concentración de los extractos de *H. novogalicianus* hasta 1 mg/mL, sin embargo tampoco presentaron actividad antibacteriana en este nuevo rango de concentraciones, por ello se aumentó una vez más el rango de concentraciones a evaluar en esta ocasión la concentración más alta fue de 20 mg/mL, con lo cual el extracto acetónico presentó una CMI de 20 mg/mL en *B. subtilis*, mientras que el extracto etanólico sólo mostró actividad antibacteriana en *B. subtilis* con una CMI de 10 mg/ mL, sin embargo el extracto metanólico no mostró actividad antibacteriana en ninguna de las bacterias evaluadas, por otro lado el extracto hexánico presentó actividad antibacteriana sobre *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* con una CMI en el rango de 20 mg/mL a 5 mg/mL. Cabe señalar que el fármaco control positivo de inhibición para cada una de las evaluaciones Trimetoprima con sulfametoxazol tuvo una CMI de 32 µg/mL para *E. coli*, de 64 µg/mL para *P. aeruginosa*, de 0.125 32 µg/mL para *S. aureus* y finalmente de 4 µg/mL para *B. subtilis*.

Por otro lado, los resultados también pueden ser el reflejo de que algún metabolito o conjunto de ellos, que pudieran ser los relacionados con la actividad antimicrobiana en la planta *H. novogalicianus* se encuentran en menor cantidad en esta especie en comparación con algunas otras de la misma subfamilia, incluso puede haber una concentración menor de estos metabolitos en los diferentes extractos, la elaboración de los extractos así como los disolventes utilizados para la extracción de los metabolitos secundarios de las plantas juegan un papel importante ya que de ellos dependerán los metabolitos a extraer, por tal motivo se realizó la evaluación antibacteriana de *H. novogalicianus* de un extracto acuoso

de la planta sin que esta pasara por el proceso de secado y concentración, con la finalidad de encontrar algún metabolito con actividad antibacteriana que pudiera degradarse en estas etapas de elaboración. En primer lugar, se determinó el efecto antibacteriano de los extractos acuosos en las 4 bacterias previamente evaluadas, mediante el método de difusión en agar con ayuda de penicilindros, para el cual no se logró observar ningún halo de inhibición en las placas, debido a que los extractos no lograron difundirse en la placa de agar después del tiempo de incubación, por tal motivo se buscó una alternativa para determinar el efecto antibacteriano. La alternativa más factible fue la perforación del agar con ayuda de un sacabocados estéril, la adición del extracto en los pocillos realizados en el agar es un método, que a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad de extracto, facilitando la evaluación antibacteriana (Magallanes y cols., 2003, Rojas y cols., 2005). Transcurrido el tiempo de incubación se logró observar en primer lugar, que los extractos si lograron difundirse en el agar, sin embargo, solo el extracto acuoso de flores y hojas logró inhibir el crecimiento de *B. subtilis* (Figuras: 9- 13). Los métodos de difusión en agar han sido ampliamente utilizados para evaluar la actividad antibacteriana de extractos de plantas (Padilla y Gil, 2012; Magallanes y cols., 2003, Cruz y cols., 2010). En general se propone utilizar los métodos de difusión para estudiar compuestos polares (Ramírez y Castaño, 2009). Dentro de los estudios que se han realizado encontramos a Magallanes y cols., quienes en 2003 utilizaron la técnica de difusión en agar con ayuda de un sacabocados estéril, ellos determinaron la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas en bacterias Gram positivas y Gram negativas, teniendo como resultados que 5 de los 12 extractos presentaron un halo de inhibición en las bacterias Gram positivas. Al igual que Avello y cols., quienes en 2012, evaluaron el efecto antimicrobiano de aceites esenciales de plantas chilenas de las familias *Lauraceae* y *Atherospermataceae* bajo la técnica de difusión en agar con ayuda de un sacabocados estéril, teniendo como resultado la inhibición de las cepas bacterianas utilizadas (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*).

Por otro lado se determinó la actividad antifúngica del extracto acetónico, etanólico, hexánico y metanólico de *H. novogalicianus*, las concentraciones en las que fueron evaluados estos extractos son de 20 mg/mL a 0.039 mg/mL, ya que se tenía como antecedente los rangos de concentración en los cuales se observó una inhibición del crecimiento en bacterias, para la determinación del efecto antifúngico se emplearon 3 diferentes levaduras del género *Cándida*; *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*.

El extracto acetónico, etanólico y metanólico no mostraron actividad antifúngica contra las levaduras evaluadas, sin embargo, el fármaco control positivo de inhibición Fluconazol mostro una CMI de 64 µg/mL para *C. albicans* y *C. tropicalis*, mientras que para *C. glabrata* mostro una CMI de 32 µg/mL, por otro lado, el extracto hexánico, inhibió el crecimiento de *C. albicans* y *C. tropicalis* teniendo una CMI de 20 mg/mL, mientras que para *C. glabrata* mostro una CMI de 10 mg/mL. La búsqueda de nuevos agentes con posible actividad antifúngica se ha centrado recientemente en los productos naturales, ya que han demostrado poseer compuestos que son capaces de inhibir el crecimiento de levaduras y otros hongos, dentro de estos compuestos de encuentran los terpenoides, saponinas, compuestos fenólicos, alcaloides e incluso algunos péptidos y proteínas (Spampinato Leonardi, 2013). Tal es el caso de Shaista y cols.(2017), quienes ante la emergente resistencia a los antifúngicos que presentan diferentes especies de *Candida* en 2017 evaluaron el efecto antifúngico de 6 extractos etanólicos procedentes de plantas utilizadas en la india dentro de la medicina tradicional (*A. sativum*, *C. dichotoma*, *C. dichotoma*, *S. cumini* y *T. feonum- grecum*), sobre 50 aislados clínicos de *Candida* spp, resistentes a los antifúngicos comúnmente utilizados, los resultados que obtuvieron mostraron que los extractos presentaron actividad antifúngica con una CMI en el rango de 25- 1.56 mg/mL, concentraciones muy similares a las obtenidas en este trabajo. Por otro lado, Sampaio y cols. (2017), evaluaron la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico y etanólico de *S. obtusifolium*, que ha sido utilizada dentro de la medicina tradicional para un gran número de enfermedades como son: diabetes, infecciones genito-urinarias, inflamación del ovario, problemas cardiacos entre otros. La evaluación antifúngica se realizó sobre *C. albicans* teniendo una CMI de 0.5 mg/mL para ambos extractos (Araujo-Netol y cols., 2010, Sampaio y cols., 2017).

El perfil fitoquímico de las plantas depende de numerosos factores como el genotipo, la edad fisiológica de la planta, el tipo de órgano, las condiciones edafoclimáticas, el momento del corte y el procesamiento de la muestra, y de ello dependerá también la actividad biológica que posean (Rubio y cols., 2018).

Los mecanismos mediante los cuales los metabolitos secundarios inhiben el crecimiento se han vinculado con cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana celular y la interferencia con procesos metabólicos vitales en los microorganismos patógenos. Los flavonoides pueden afectar el crecimiento microbiano por inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos y otros procesos metabólicos; mientras que las sustancias de naturaleza

terpenoide pueden interferir con la síntesis de los componentes de las membranas biológicas (Nayak y cols., 2010). De igual manera, los taninos y los compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento bacteriano, debido a la capacidad que tienen estas sustancias de formar complejos irreversibles con proteínas, lo cual afecta sus propiedades biológicas y ocasiona la muerte de los microorganismos (Cowan, 1999). Los taninos también pueden disminuir la actividad de enzimas bacterianas mediante la quelatación de iones imprescindibles para la función catalítica de estos polipéptidos (Rubio y cols., 2018).

Es importante señalar que la actividad antimicrobiana relacionada con *H. novogalicianus* no ha sido descrita aun, pero existen algunos trabajos donde se describe esta actividad para otras especies pertenecientes a la subfamilia *Hyacinthaceae* a la cual pertenece *H. novogalicianus* (Notten y Kirstenbosch, 2002; Bisi- Johnson y cols., 2011). De igual manera en la literatura se han descrito algunos metabolitos secundarios presentes en esta subfamilia, dentro de los cuales destacan compuestos de tipo flavonoide, homoisoflavonas, esteroides, bufadienólidos, estilbenos, alcaloides y ácidos grasos (Du Toit y cols., 2007). En estudios fitoquímicos preliminares del extracto hexánico de *H. novogalicianus* se identificaron diferentes metabolitos secundarios como índoles y sus derivados, compuestos carbonílicos, esteroides y ácidos grasos insaturados (Flores – Morales y cols., 2014). Los ácidos grasos forman parte de los fosfolípidos, que son componentes estructurales de las membranas celulares, fungen como reservas de energía, al ser metabolitos primarios participan en la síntesis de otros componentes, y estudios han demostrado que algunos ácidos grasos presentan actividad contra agentes patógenos de las plantas y se ha demostrado en estudios *in vitro* la actividad antibacteriana de algunos de ellos sobre diferentes agentes patógenos (Agoramoorthy y cols., 2007), si bien el extracto hexánico fue el que mostro inhibición en el crecimiento de los dos microorganismos evaluados (bacterias y levaduras), los extractos acetónico y etanólico también mostraron inhibición del crecimiento bacteriano sobre *B. subtilis*, aunque no hay estudios fitoquímicos hasta este momento de estos extractos es posible que en ellos se encuentren metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana; como flavonoides y terpenoides. Debido a la poca información fitoquímica de *H. novogalicianus*, no es posible hacer una correlación directa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos, con la actividad antibacteriana que presentaron, sin embargo es posible realizar una comparación con lo que se encuentra reportado en la literatura acerca de la subfamilia a la cual pertenece.

Finalmente, se realizó la caracterización de los cambios morfológicos y ultra estructurales mediante MEB y MET, que presentaron los microorganismos después de ser expuestos al extracto hexánico con la finalidad de conocer los posibles blancos afectados que ocasionan la inhibición del crecimiento e inclusive la muerte celular.

Respecto al análisis ultra estructural en bacterias (*B. subtilis* y *P. aeruginosa*), se observó en las micrografías electrónicas de transmisión y de barrido correspondientes al control de crecimiento y al control disolvente DMSO 1%, que no hay daño visible en la célula bacteriana, ya que presentan una morfología celular normal con una densidad electrónica homogénea en el citoplasma y las estructuras celulares internas eran normales, de igual manera se observó una membrana celular intacta y una pared con una densidad de electrones uniforme. En contraste, en las células bacterianas que fueron expuestas al control positivo de inhibición Trimetoprima con sulfametoxazol se observaron alteraciones en el citoplasma y material genético de la célula, lo cual es concordante con el mecanismo de acción de estos compuestos ya que son inhibidores potentes y selectivos de dos enzimas clave en la ruta biosintética del folato; dihidrofolato reductasa (DHFR) y dihidropteroato sintasa (DHPS), la alteración de las vías de folato inhibe la producción de intermediarios clave para la síntesis de proteínas y nucleósidos de ADN, lo que finalmente conduce a la muerte celular (Figura 14, 16 y 17) (Napon y cols., 2018).

Por otro lado, en los cultivos de *B. subtilis* expuestos a diferentes concentraciones del extracto hexánico, se observó el daño que éste provocó sobre la célula bacteriana, a 1 CMI (5 mg/mL) se aprecia en las micrografías electrónicas la presencia de endoesporas, sin embargo con forme se aumentó la concentración la cantidad de estas disminuyó en su totalidad, con lo cual se puede sugerir que el extracto posee efecto esporicida, también se pudo observar una gran cantidad de restos celulares presentes, y células bacterianas dañadas que eran translúcidas de electrones en comparación con el control de crecimiento (Woo Kyung y cols., 2008) (Figura 16). Los cultivos de *P. aeruginosa*, expuestos al extracto hexánico mostraron células lisadas con paredes y membranas rotas, y por lo tanto se presentó una disminución en la densidad electrónica del citoplasma, de igual manera se observó la condensación del material genético en la célula bacteriana (Figura 17) (Myung-Jin y cols., 2019).

De igual manera en el cultivo de *C. albicans* expuesto a diferentes concentraciones del extracto hexánico se observa claramente el daño a nivel citoplasmático, y una alta cantidad de cuerpos intravacuolares, además de alteraciones a nivel de núcleo y mitocondrias, que

aumenta conforme aumenta la concentración del extracto, con lo cual podemos suponer que el extracto afecta la integridad del material genético y por ende el material citoplasmático de los microorganismos expuestos (Figura 18). Respecto a los cultivos expuestos al control positivo de inhibición Fluconazol, se logró observar una alta cantidad de cuerpos intravacuolares, así como una deformación de la membrana citoplasmática, ya que este fármaco tiene como mecanismo de acción la inhibición de la enzima lanosterol 14-alfa demetilasa en el complejo citocromo P-450 de los hongos. El resultado es la inhibición de la conversión de lanosterol a ergosterol, con la consecuente depleción de ergosterol, acumulación de precursores y una pérdida de la integridad de la membrana fúngica (Díaz y Garcés, 2012).

Estos fenómenos sugieren los posibles mecanismos antimicrobianos por los cuales el extracto hexánico inhibe el crecimiento de estos microorganismos, así como la respuesta celular en bacterias (Gram positivas y Gram negativas) y levaduras.

Aunque los mecanismos subyacentes a las acciones antimicrobianas del extracto hexánico todavía no se comprenden completamente, es importante resaltar los resultados obtenidos en este trabajo ya que pueden ser utilizados como referencia para otras investigaciones dado que en la literatura no hay estudios similares con extractos de plantas.

10.0 Conclusiones.

- Los extractos orgánicos de *H. novogalicianus* presentan actividad antimicrobiana sobre bacterias y levaduras de interés clínico.
- El extracto acetónico de *H. novogalicianus* presentó actividad antibacteriana sobre *B. subtilis* con una CMI de 20 mg/mL.
- El extracto etanólico de *H. novogalicianus* presentó actividad antibacteriana sobre *B. subtilis* con una CMI de 10 mg/mL.
- El extracto hexánico de *H. novogalicianus* presentó actividad antibacteriana sobre *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* con una CMI en el rango de 20 mg/mL a 5 mg/mL, además mostro inhibición sobre el crecimiento de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, mostrando una CMI en el rango de 20 -10 mg/mL.
- El extracto hexánico provocó cambios ultra estructurales en el citoplasma y material genético en bacterias, mientras que en levaduras se presentan alteraciones a nivel de membrana, citoplasma, mitocondrias y núcleo.

13.0 Perspectivas

- Realizar la evaluación antimicrobiana de los extractos que no presentaron actividad antibacteriana y antifúngica en un rango de concentración mayor al evaluado en este trabajo.
- Realizar ensayos de citotoxicidad de los extractos evaluados, principalmente del extracto hexánico, sobre diferentes líneas celulares (VERO, IPEC- J2), para obtener los índices de selectividad.
- Evaluar en distintos modelos *in vivo*, las propiedades toxicológicas del extracto con mayor actividad antimicrobiana.
- Debido a la actividad antiparasitaria de algunas plantas pertenecientes a la subfamilia *Hyacinthaceae*: Determinar la CMI de los extractos en parásitos protozoarios de interés clínico; como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.
- Aislar e identificar el o los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana del extracto hexánico de *H. novogalicianus*.

12.0 Bibliografía.

- Abdelaaty A. Shahat, Elsayed A. Mahmoud, Abdullah A. Al-Mishari, y Mansour S. Alsaid. (2017). "Antimicrobial activities of some saudi arabian herbal plants". Afr J Tradit Complement Altern Med.; 14(2): 161–165.
- Afolayan A.J. y Meyer J. J. M. (1997). "The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*". J Ethnopharmacol.; 57:177–181.
- Agoramoorthy G.A., Chandrasekaran M., Venkatesalu V. y Hsu M.J." Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind –your- eye Mangrove from India" (2007). Brazilian Journal of Microbiology (38): 739-742.
- Andrade-Guel M. L., López-López L. I., y Sáenz- Galindo A. (2011). "Estudio sintético y caracterización por infrarrojo de derivados 2-(amino)-1,4-naftoquinona y su evaluación antibacteriana preliminar". Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 14:75-82.
- Aoki M., Kazuko; Dimayuga Encarnación Rosalba; Cortés A., Alma Rosa. (2005). "Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 36 (1): 11-17.
- Araby a S.Y. y Tablawy S.T. (2016). "Inhibitory effects of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*". Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology; 159: 24-32.
- Arango Acosta Gabriel J. (2008). "Alcaloides y compuestos nitrogenados." Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf> . Fecha de consulta 17 mayo 2016.
- Araujo-Netol Vitor, Rangel R. BomfimI, Valter O. B. Oliveira; Ailane M. P., PassosI Juliana, OliveiraI Clésio A. Limall; MendesI Sandra S., EstevamII, Charles S.,

Thomazzil Sara M. (2010). "Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation". *Rev. Bras. Farmacogn* 20:(6).

- Atanasov Atanas G., Birgit Waltenberger, Pferschy-Wenzig Eva-Maria, Linder Thomas, Wawrosch Christoph, Uhrin Pavel, Temml Veronika, Limei Wang, Schwaiger Stefan, ElkeH. Heiss, Rollinger Judith M., Schuster Daniela, Johannes M. Breuss, Bochkov Valery, Mihovilovic Marko D., Kopp Brigitte, Bauer Rudolf, Dirscha Verena M., Hermann Stuppner. (2015). "Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review". *Biotechnology Advances* 33: 1582–1614.
- Ávalos García Adolfo y Pérez-Urria Carril Elena. (2009). "Metabolismo secundario de plantas". *Reduca. Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145, ISSN: 1989-3620.
- Avendaño López María del Carmen. (2010). "Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una Visión de conjunto". Revisión. Disponible en: <http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjZ1pDGhOfMAhXpyoMKHVyaAhMQFqgnMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.analesranf.com%2Findex.php%2Faranf%2Farticle%2Fdownload%2F1150%2F1196&usq=AFQjCNFr7r2qwt2u4d7v7G3oa-qPwoYdJQ&bvm=bv.122448493,d.amc>.
- Backes G. L., Neumann D. M., y Jursic B. S. (2014). "Synthesis and antifungal activity of substituted salicylaldehyde hydrazones, hydrazides and sulfohydrazides." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 22: 4629-4636.
- Becerra B.S. (2011). "Estudio fitoquímico de los extractos metanólicos y clorofórmicos del propóleo de la región de Jerez de García Salinas Zacatecas". Tesis de licenciatura Universidad autónoma de Zacatecas, México.

- Bénéré E., Inocencio da Luz R.A., Vermeersch M., Cos P. y Maes L. (2007). "A New quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites.". *Journal of Microbiological Methods*. 71: 101-106.
- Bennett Richard N. y Wallsgrove Roger M. (2006). "Secondary Metabolites and Plant Defense". *Plant Physiology*, 4ta edición. Capítulo 13
- Breinbauer R, I. R. Vetter, H. Waldmann. *Angewandte. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2878–2890.
- Bisi-Johnson Mary A, Chikwelu L Obi, Toshio Hattori, Yoshiteru Oshima, Shenwei Li, Learnmore Kambizi, Jacobus N Eloff, y Sandeep Vasaiakar.(2011)." Evaluation of the antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal plants". *Complementary and Alternative Medicine* 2011, 11:14: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/14>.
- Bonkanka Tabares Celia X. (2006). "Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal". Tesis Doctoral. Disponible en: <ftp://tesis.bbtk.ull.es/ccppytec/cp282.pdf> . Fecha de consulta: 28 de mayo 2016.
- Bucar, F., Wube, A., Schmid, M. (2013). "Natural product isolation how to get from biological material to pure compounds". *Nat. Prod. Rep.* 30, 525–545.
- Calzada Fernando, Correa-Basurto José, Barbosa Elizabeth, Mendez-Luna David, y Yopez-Mulia Lilian. (2017)."Antiprotozoal Constituents from *Annona cherimola* Miller, a Plant Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Diarrhea and Dysentery". *Pharmacogn Mag.*;13(49): 148–152.
- Calzada-Fernando, Correa-Basurto José, Barbosa Elizabeth, Velázquez Claudia, García Hernández Normand, Ordoñez Razo R.M., Méndez-Luna David, y Yopez-Mulia Lilian. (2017). "Antiprotozoal Activities of Tiliroside and other Compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don." *Pharmacognosy Res.*; 9(2): 133–137.

- Cantón Lacasa E. y Mazuelos Martín, E. (2007). "Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos". Rev. Iberoamericana de Micología -ISBN.
- CLSI. (2017). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.M-100 27th edition".
- CLSI M27 S-4. (2012). "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement". 4th edition.
- Colorado Jhony R., Galeano Elkin J y Martínez Alejandro M. (2007). "Desarrollo de la bioautografía directa como un método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*". *Vitae* 14 (1): 67-71.
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582
- Cruz-Carrillo, A., Rodríguez N.,N. y Rodríguez, C.E. (2010). "EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*". *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.* 13 (2): 117-124.
- David, B., Wolfender, J.L., Dias, D.A. (2015). "The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem. Rev.* 14 (2), 299–315.
- Dahlgren R., Clifford H., Yeo P. (1985). "The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy". Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania,
- De Bellis Lorena. (2013)." Evaluación de la actividad de extractos y aceites vegetales de plantas de la región contra *Proteus mirabilis* uropatogenico". Disponible en:
 - <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1533/1/uy24-16407.pdf> Fecha de consulta: 27 de noviembre 2017.

- Dewick Paul M. (2009). "Medicinal natural products: a biosynthetic approach". John Wiley & Sons, 4ª edición.
- Díaz Alejandro y Garcés Carlos (2012). "Current use of triazole antifungal agents in children". *Infectio*, 16 (3); 82- 93.
- Domínguez X.A. "Métodos de investigación fotoquímica". Editorial Limusa, México D.F., 1985.
- Du Toit K., Elgorashi E.E., Malan S.F (2007). "Antibacterial activity and QSAR of homoisoflavanones isolated from six *Hyacithaceae* species". *South African Journal of Botany* 2(73): 236-241.
- Enríquez E.D., Koch S.D. y González E.M.S.(2003). "Flora y vegetación de la sierra de órganos, municipio de Sombrerete, Zacatecas, México". DOI: <https://doi.org/10.21829/abm64.2003.928>
- Faisal Hayat, Attar Salahuddin y Amir Azam. (2010). "Synthesis, characterization, antiamebic activity and cytotoxicity of new pyrazolo[3, 4-d]pyrimidine-6-one derivatives." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2011; 26(4): 472–479.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (F.E.U.M.) Métodos generales de análisis. Fluido gástrico simulado, tomo II.
- Flores-Morales Virginia, Castañeda Hernández Oswaldo, Montiel Santillán Tomás y Hernández Delgadillo Gloria Patricia. (2014). "Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una Especie endémica de México". *Investigación y Ciencia*; 22 (63): 18-23.
- Flores-Morales Virginia, Hernández Delgadillo Gloria Patricia, Rios Yolanda Maria, Montiel Santillán Tomás y Guerra Ramirez Miguel Angel. (2016). "Estudio químico-biológico del extracto acetónico de las hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*." DOI: 10.13140/RG.2.2.29938.50884 -Available from: Virginia Flores-Morales, Oct 13,

2016. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/309127001_ESTUDIO_QUIMICO-BIOLOGICO_DEL_EXTRACTO_ACETONICO_DE_LAS_HOJAS_DE_Hemiphylacus_novogalicianus .

- Gaidamashvili M. y van Staden J. (2002). "Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*." *J. Ethnopharmacol.*, 80: 131–135.
- Gutiérrez Ravelo Ángel y Estévez Braun Ana. (2009). "Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI". *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.*; 103 (2): 409-419.
- Hernández Morales Paola. (2015). "Glucosidos". Disponible en: <https://sites.google.com/site/bq20152hernandezpaola/unidad-1-fundamentos-de-la-bioquimica/1-2-2-2-glucosidos> . Fecha de consulta: 31 de mayo 2016.
- I.B. Instituto de Biología. "Hemiphylacus novogalicianus L. Hern. - IBUNAM: MEXU:PVT162584". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-06-14. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2017-8-14.
Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVT162584>.
- Jiménez Carlos. (2013). "El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual" *An. Quím.*, 109(2), 134–141
- Jorgensen J.H., Ferraro M.J. (2009) "Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices". *Clin. Infect. Dis.*49: 1749–1755.
- JP Anthony, Fyfe L, Smith H. Plant active components a resource for antiparasitic agents. *Trends Parasitol.* 2005; 21:562-68.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*.

- Lopez – Malo A., Palou E., Parish M., y Davidson P. (2005). “Methods for activity assay and evaluation of results”. Antimicrobials in food 3ra edición capítulo 21: 659-680.
- Magallanes Claudio, Córdova Cesar y Orozco Rita. (2003). “Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú”. Rev. peru biol. 10 (2).
- Magaña Miguel Alberto Alejandro, Gama Campillo Lilia Ma. y Mariaca Méndez Ramón. (2010). “el uso de las plantas medicinales en las comunidades mayachontales de Nacajuca, Tabasco, México.” Polibotánica, 29: 213-262.
- Marcano Deanna y Hasegawa Masahisa. (2002). “Fitoquímica Orgánica”. Universidad central de Venezuela. Editorial Torino, 2da edición, capítulo 3.
- Martínez V. Autor de la página Botanical. México. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/plantasmedicinalesimportancia.htm>. Fecha de consulta: 18 de mayo 2016.
- Myung-Jin Lee , Jae-Sung Kwon , Heng Bo Jiang , Eun Ha Choi , Gyungsoon Park, y Kwang-Mahn Kim. (2019). “The antibacterial effect of non-thermal atmospheric pressure plasma treatment of titanium surfaces according to the bacterial wall structure”. Sci Rep., 9:1938. Doi: 10.1038 / s41598-019-39414-9
- Mojica Diana N., Ramírez- Rueda Román y Espitia Mery L. (2015). “Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina”. Salud Soc Uptc. 2015; 2(1): pp. 27-32.
- Morales - Rubio ME, Morales- Vallarta MR, Treviño Neavez JF, Grarza Padrón RA, Mar Aguilar F y Barron Gonzales MP. (2010). “Actividad amebicida de extractos de tejidos in vitro e in vivo de 4 especies de cactáceas sobre *E. histolytica*”. Toctl Disponible en :

https://www.researchgate.net/profile/Ramon_Rodriguez_Garza/publication/304566578_ACTIVIDAD_AMEBICIDA_DE_EXTRACTOS_DE_TEJIDOS_IN_VIVO_E_IN_VITRO_DE_CUATRO_ESPECIES_DE_CACTACEAS SOBRE ENTAMOEBIA HISTOLYTICA/links/577377f108ae2b93e1a7d70c/ACTIVIDAD-AMEBICIDA-DE-EXTRACTOS-DE-TEJIDOS-IN-VIVO-E-IN-VITRO-DE-CUATRO-ESPECIES-DE-CACTACEAS-SOBRE-ENTAMOEBIA-HISTOLYTICA.pdf

- Mounyr Balouiri , MoulaySadiki y Saad Koraichi Ibsouda. (2016). “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review”. Journal of Pharmaceutical Analysis 6: 71–79.
- Molina Murillo Ángela G. 2012. “Estudio de la valeriana officinalis como relajante en el ser humano”. Monografía previa a la obtención del título de Químico farmacéutico. Disponible en: <http://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/reducacue/6509/1/Estudio%20de%20la%20valeriana%20officinalis%20como%20relajante%20en%20el%20ser%20humano.pdf> . Fecha de consulta 28 de octubre 2016.
- Mulholland Dulcie A., Schwikkardab Sianne L. y Crouch Neil R. (2013). “The chemistry and biological activity of the Hyacinthaceae”. Review. Nat. Prod. Rep., 2013, 30, 1165.
- Murphy Cowan Marjorie. (1999). “Plant Products as Antimicrobial Agents”. Clin Microbiol Rev.; 12(4): 564–582.
- Mwafongo E. y Magombo Z. (2010). “Ethnobotanical study of *Hyacinthaceae* and non-hyacinthaceous geophytes in selected districts of Malawi”. Etnobotany Research & Applications (8): 75-93.
- Napon Nilchan, Wanida Phetsang, Taechin Nowwarat, Soraya Chaturongakul, Chutima Jiarpinitnun. (2018). “Halogenated trimethoprim derivatives as multidrug-resistant Staphylococcus aureus therapeutics”. Bioorganic & Medicinal Chemistry. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089618304231?via%3Dihub> .

- Nayak BS, Ramdath DD, Marshall JR, Isitor GN, Eversley M, Xue S, Shi J (2010) Wound healing activity of the skin of the common grape (*Vitis vinifera*) Variant, Cabernet Sauvignon. *Phytotherapy Research* 24(8): 1151-1155; doi:10.1002/ptr.2999
- Neira Laura Fernanda, Stashenko Elena y Escobar Patricia. (2014). "Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia *Euphorbiaceae*". *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud* vol.46 no.1
- Neslihan Ö., Saliha A., Hamit A., Ertan S. y Nurcan K. (2013). "Synthesis, characterization and anti-microbial evaluation of Cu(II), Ni(II), Pt(II) and Pd(II) sulfonylhydrazone complexes; 2D-QSAR analysis of Ni(II) complexes of sulfonylhydrazone derivatives". *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 108: 123-132.
- Notten A, Kirstenbosch NBG: *Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt Family: Hyacinthaceae (Hyacinth Family). 2002 [<http://www.plantzafrica.com/frames/plantsfram.htm>].
- Padilla González Guillermo F. y Gil Archila Elizabeth M. (2012). "Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. (limoncillo)" *Rev Cubana Plant Med*. 17(1).
- Picazo Juan. (2000). "Procedimientos en microbiología clínica: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos". Disponible en: http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf. Fecha de consulta: 3 noviembre 2016.
- Pires, J. C.; Maureira, I. J., Givnish, T. J., Sytsma, K. J., Seberg, O., Petersen, G., Davis, J. I., Stevenson, D. W., Rudall, P. J., Fay, M. F., y Chase, M. W. (2006). "Phylogeny, genome size, and chromosome evolution of Asparagales". *Aliso* (22): 278-304.

- Pohl T.S., Crouch N.R. y Mulholland D.A.(2000). "Southern Africa Hyacinthaceae: Chemistry, bioactivity and Etnobotany". *Current Organic Chemistry* 12(4): 1287-1324.
- Quave C. L., Plano L. R., Pantuso T. y Bennett, J. B. C. (2008) *Ethnopharmacol.*, 118: 418–428.
- Ramírez Luz S. y Castaño Darwin M. (2009). "Metodologías para evaluar *In vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal". *Scientia et technica* ; 42: 263- 268.
- Reyes – Jurado F., Palou E. y López Malo A. (2014). "Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y la determinación de los componentes químicos de aceites esenciales". *Temas selectos en ingeniería de alimentos*: 68- 78.
- Rojas Jhon, García Aura M. y López Albin J. (2005). "Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales". *BLACPMA*. 4 (2): 28.
- Rubio Fontanills Yasmery, Valdivia Ávila Aymara, Camacho Campos Conrado, Matos Trujillo Madyu, Sosa del Castillo Maryla y Pérez Hernandez Yunel. (2018). "Composición fitoquímica y actividad antibacteriana de extractos de hoja de *Hamelia patens* Jacq." *BiotVeg* 18(1): 37- 45.
- Sampaio TP., Cartaxo-Furtado NA., De Medeiros AC., Alves HS, Rosalen P., Pereira J. (2017). "Antimicrobial Potential of Plant Extracts and Chemical Fractions of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn on Oral Microorganisms." *J. Contemp Dent Pract.*;1;18(5):392-398.
- Shaista Khan, Mohd Imran, Mohammed Imran, y Nuzhat Pindari, (2017). "Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant *Candida* spp." *Bioinformation*; 13(3): 67–72.

- Shing S. A. (2011). "Herbalism, phytochemistry and ethnopharmacology CRC Press & Taylor& Francis USA.
- Spampinato Claudia y Leonardi Dario. (2013). "Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents". Biomed Res Int.; 2013: 204237.
- Stevens, P. F. (2006). "Liliaceae". Angiosperm Phylogeny,). Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/lilialesweb.htm#Liliaceae>. Fecha de consulta: 2 mayo 2016.
- Valgas Cleidson, Machado de Souza Simone, Smâniail Elsa y Smânia Jr Artur. (2007). "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products." Braz. J. Microbiol. vol.38 no.2.
- Woo Kyung Jung, Hye Cheong Koo, Ki Woo Kim, Sook Shin, So Hyun Kim, y Yong Ho Park. (2008). "Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*". Appl Environ Microbiol. 74(7): 2171–2178.
- Zavala Ocampo Lizeth Mariel, Marchat Marchau Laurence, Soto Sánchez Jacqueline, Ramírez Moreno María Esther, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. (2016). "Evaluación del efecto antiamebiano del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*. sobre *Entamoeba histolytica*.". Disponible en: http://asociacionmexicanamicrobiologia.org.mx/wpcontent/uploads/2016/08/ZAVALA_LIZETH_MARIEL_344.pdf

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Guadalupe Barón Pichardo.

Título de la tesis:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



04 de Marzo del 2019

Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

Firma del miembro del jurado

Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Guadalupe Barón Pichardo.

Título de la tesis:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Blanca Estela Duque Montaña

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dra. Blanca Estela Duque Montaña
Firma del miembro del jurado

04 de Marzo del 2019

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Guadalupe Barón Pichardo.

Título de la tesis:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

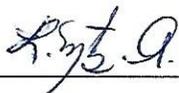
Miembro del jurado: Dra. Luisa Martínez Aguilar.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. Luisa Martínez Aguilar.
Firma del miembro del jurado

04 de Marzo del 2019

Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Miriam Guadalupe Barón Pichardo.

Título de la tesis:

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Hemiphylacus novogalicianus*".

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Crystal Columba Palomares.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. María Crystal Columba Palomares.
Firma del miembro del jurado

04 de Marzo del 2019

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN
FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Guadalupe Barón Pichardo.

Título de la tesis:

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE
Hemiphylacus novogalicianus".

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Esther Ramírez Moreno.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. María Esther Ramírez Moreno.
Firma del miembro del jurado

04 de Marzo del 2019

Fecha