



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA



EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE ZARZAMORA (*Rubus liebmannii*) FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS AL HOMBRE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA

ROSALES FLORES ERIK

DIRECTOR: DRA. PATRICIA RIVERA GARCÍA

ASESOR: BIÓL. MARICELA ARTEAGA MEJÍA

MÉXICO, DF, AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado para la terminación de mis estudios de Licenciatura, por abrirme sus puertas y ofrecerme un mundo de experiencias.

A mis grandes maestros que con entrega, ejemplo, disciplina y pasión permearon en mí la sed del conocimiento y los valores que llevaré el resto de mi vida. En especial agradezco el apoyo de mi admirable maestra Patricia Rivera García por tomar las riendas de mis estudios y llevarlos a un buen fin. Agradezco a mi maestra Ma. De Jesús Sánchez Colín por los detalles dentro del Laboratorio y salidas a campo, siempre la recordaré con mucho cariño.

A mis entrañables compañeros del laboratorio Ricardo, Sandra, Ángel, Don Cesar, Cesar Jr., Esaú, Yuvani, Gloria, Gonzalo, Anayeli, Carlos, Paulina, Fabián, Nathalie y muchos más que con su agradable compañía, buenos consejos y bromas hicieron muy amenos los momentos de trabajo.

A mis grandes amigos Paul y Eus que estuvieron siempre dispuestos a apoyarme.

DEDICATORIA

De manera muy especial dedico este trabajo a mi querida familia que con amor, paciencia y entrega fueron el aliento para concluir este ciclo y la inspiración para hacer las cosas siempre mejor, mejor y mejor. Lo dedico a la vida misma que siempre fue generosa ofreciéndome a cada instante salud, alegría y provisión.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	
LA BÚSQUEDA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES	
1.1.- ¿Qué es un agente antimicrobiano?	5
1.2.- Efecto de los agentes antimicrobianos sobre el crecimiento bacteriano.....	5
1.3.- Patogenicidad bacteriana.....	6
1.3.1.- Métodos para la detección de la sensibilidad a antimicrobianos.....	6
1.3.2.- Prueba de sensibilidad por difusión con discos.....	6
1.3.3.- Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	6
1.4.- Metabolismo de las plantas.....	6
1.4.1.- Metabolitos primarios de las plantas	7
1.4.2.- Metabolitos secundarios de las plantas.....	7
1.5.- Extractos de plantas	9
1.5.1.- Principales métodos extractivos.....	10
1.6.- Principio activo en plantas.....	11
1.7.- Estudio espectrofotométrico en infrarrojo.....	12
CAPÍTULO II	
EL USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA	
2.1.- ¿Qué es una planta medicinal?.....	13
2.2.- Plantas medicinales en la época prehispánica.....	13
2.2.1.- Códice de la Cruz-Badiano.....	14
2.3.- Propiedades y efectos de las plantas medicinales.....	16
2.4.- Características generales de la zarzamora.....	17
2.4.1.- Características botánicas de la zarzamora.....	17
2.4.2.- Características de <i>Rubus liebmannii</i> Focke (zarzamora).....	18
2.5.- Registro del empleo de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) en la Región de los Volcanes, Estado de México.....	19
OBJETIVOS	20
JUSTIFICACIÓN	21

HIPÓTESIS	21
MÉTODO	22
Área de colecta.....	22
Diseño experimental.....	23
Pruebas de espectroscopia de infrarrojo.....	25
RESULTADOS	26
Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora)...	26
Prueba de toxicidad.....	37
Presencia de grupos funcionales en tallo de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora)....	38
Presencia de grupos funcionales en hoja de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora)....	39
Presencia de grupos funcionales en fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora)....	40
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42
GLOSARIO	46

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.- Diámetro promedio entre las diferentes estructuras del extracto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Streptococcus pyogenes</i>	29
Gráfica 2.- Diámetro promedio entre las diferentes concentraciones del extracto de fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Streptococcus pyogenes</i>	30
Gráfica 3.- Diámetro promedio entre las diferentes estructuras del extracto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Corynebacterium xerosis</i>	31
Gráfica 4.- Diámetro promedio entre las diferentes concentraciones del extracto de fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Corynebacterium xerosis</i>	32
Gráfico 5.- Diámetro promedio entre las diferentes concentraciones del extracto de fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Bacillus subtilis</i>	33
Gráfica 6.- Comparación de las diferencias en el diámetro de los halos de inhibición para el fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Shigella flexneri</i> y <i>Streptococcus mutans</i>	36
Gráfica 7.- Espectro de infrarrojo para el extracto etanólico de tallo de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora).....	38
Gráfica 8.- Espectro de infrarrojo para el extracto etanólico de hoja de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora).....	39
Gráfica 9.- Espectro de infrarrojo para el extracto etanólico de fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora).....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación taxonómica de <i>Rubus liebmannii</i>	17
Tabla 2.- Propiedades físicas y químicas del suelo en el que crece la especie estudiada.....	22
Tabla 3.- Cepas utilizadas en la evaluación de propiedades antimicrobianas de <i>Rubus liebmannii</i>	24
Tabla 4.- Bacterias y hongos vs los extractos de tallo, hoja y fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora).....	26
Tabla 5.- Microorganismos y concentraciones en los cuales se registró actividad antimicrobiana para fruto (F), hoja (H) y tallo (T) de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora).....	27
Tabla 6.- Concentrado de las propiedades físicas y químicas del suelo en el que crece <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora).....	27
Tabla 7.- Rendimiento del extracto semisólido de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora).....	28
Tabla 8.- Prueba estadística de homogeneidad entre tratamientos vs <i>Streptococcus pyogenes</i>	29
Tabla 9.- Prueba estadística de homogeneidad entre los tratamientos vs <i>Corynebacterium xerosis</i>	31
Tabla 10.- Prueba estadística de homogeneidad entre los tratamientos vs <i>Bacillus subtilis</i>	33
Tabla 11.- Prueba de toxicidad de los extractos de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora), en su CMI vs <i>Artemia salina</i>	34
Tabla 12.- Toxicidad de los extractos de <i>Rubus liebmannii</i> en sus CMI vs <i>Artemia salina</i>	37

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.- Métodos extractivos en farmacognosia.....	10
Imagen 2.- Foja 3 del Códice De la Cruz-Badiano.....	15
Imagen 3.- Halos de inhibición del extracto del fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Streptococcus pyogenes</i>	30
Imagen 4.- Halos de inhibición del extracto del fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Corynebacterium xerosis</i>	32
Imagen 5.- Halo de inhibición del extracto del fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Bacillus subtilis</i>	34
Imagen 6.- Halo de inhibición del extracto del fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Pseudomona aeruginosa</i>	35
Imagen 7.- Halo de inhibición del extracto del fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Shigella flexneri</i>	35
Imagen 8.- Halo de inhibición del extracto del fruto de <i>Rubus liebmannii</i> (zarzamora) vs <i>Streptococcus mutans</i>	36

RESUMEN

El conocimiento empírico¹ de las comunidades en el empleo de plantas con fines medicinales es un referente en el estudio de nuevos compuestos que pueden emplear como agentes terapéuticos. En el presente trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano de los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora) sobre algunos microorganismos que afectan la salud del hombre (*Streptococcus B-hemolítico*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* y *Candida stellatoidea*).

A partir del tallo, hoja y fruto, se obtuvieron los extractos etanólicos con los que se realizaron las pruebas de sensibilidad microbiana a diferentes concentraciones (30, 60, 90 y 120 mg mL⁻¹), empleando los métodos de difusión en agar de Kirby-Bauer y la técnica de Barry.

Para ello, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de tallo, hoja y fruto para cada microorganismo. Al final se realizó un análisis espectrofotométrico de infrarrojo (IR) al extracto de cada estructura de la planta, para conocer los grupos funcionales presentes, así mismo, se hicieron pruebas de toxicidad con las CMI utilizando *Artemia salina*.

Como resultado se obtuvo que las bacterias gram positivas presentaron mayor sensibilidad a los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora) a la concentración mínima inhibitoria de 30 mg mL⁻¹ en *Corinobacterium xerosis* y en *Streptococcus pyogenes*; a 60 mg mL⁻¹ en *Bacillus subtilis*; y finalmente a 120 mg mL⁻¹ en *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Shigella flexneri* y *Pseudomona aeruginosa*.

Se hizo un análisis estadístico para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones utilizadas, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de 30 y 90 mg mL⁻¹ del extracto de fruto vs *Corinobacterium xerosis* y entre las concentraciones de 60 y 90 mg mL⁻¹ del extracto de fruto vs *Bacillus subtilis*, así mismo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los extractos de fruto a las concentraciones 30, 60 y 90 mg mL⁻¹ vs *Corinobacterium xerosis* pero si se observaron diferencias visibles del efecto biológico de los extractos al aumentar la concentración. Cabe mencionar que en la comparación

¹ Referente al saber adquirido en la práctica. Un segundo significado es su condición de conocimiento válido, es decir, del que puede ser puesto a prueba o ensayado. En una tercera connotación, *empírico* equivale a factual, esto es, un enunciado empírico es el que se refiere a estados de hecho.

entre estructuras no se encontraron diferencias estadísticas significativas para los extractos de fruto, hoja y tallo vs *Streptococcus pyogenes* y tampoco para los extractos de hoja y fruto vs *Corinobacterium xerosis*.

Las pruebas de toxicidad mostraron que ninguno de los extractos fue tóxico a sus respectivas CMI. Con respecto a los estudios espectrofotométricos, se puede inferir que hay una mayor presencia de grupos funcionales en fruto destacando los grupos aromáticos (como los fenoles), aldehídos, alcanos y ácidos carboxílicos. El trabajo coadyuva el uso que se le da a *Rubus liebmannii* (zarzamora) como planta medicinal, mostrando el efecto antimicrobiano sobre algunos de los microorganismos estudiados. Se recomienda utilizar el fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) por su efecto antibacteriano, lo que se comprobó en este trabajo.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de Salud (OMS), más del 80 % de la población del planeta, utiliza las plantas para la atención de enfermedades; esta población se concentra en países menos industrializados, que coincidentemente, poseen una gran riqueza florística y cultural (Lara, 1996).

El interés por el uso de productos provenientes de fuentes naturales para el tratamiento de enfermedades de importancia pública, ha sufrido un incremento como una alternativa para el control de microorganismos patógenos del hombre (López, 2007).

La creciente incidencia de infecciones causadas por la resistencia a antibióticos conocidos por parte de bacterias patógenas, se ha convertido en un serio problema de salud. Las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden al tratamiento ordinario, y por consecuencia, se manifiesta una enfermedad prolongada y en riesgo de muerte (Lobo, 2012).

Una respuesta a este problema es el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos a partir de extractos naturales de plantas que sean efectivos en el tratamiento de la enfermedad y que sean seguros para el paciente. Actualmente, se han desarrollado una serie de trabajos que abordan la necesidad de estudiar el efecto de extractos vegetales sobre microorganismos patógenos (Aldana, 2010).

El empleo de extractos de plantas con actividad antimicrobiana, ha sido estudiado, con respuesta positiva en la región de los volcanes, particularmente con *Achillea millefolium* con la inflorescencia, hoja, tallo y raíz, siendo la inflorescencia la que presentó los mejores resultados (Zepeda, 2012); otro trabajo con temática semejante es con *Quercus obtusata*, utilizando la hoja, rama y corteza, siendo la corteza la que presentó los mejores resultados (Cruz, 2008); finalmente el trabajo con *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* con la flor, hoja, raíz y tallo, siendo la raíz la que presentó los mejores resultados en ambas especies (Martínez, 2006). Cabe mencionar que en la comparación entre especies existen diferencias debido a que algunas son herbáceas, otras arbustivas y otras arbóreas sin embargo la similitud radica en que se tratan de especies que son empleadas con fines medicinales y que crecen en el mismo tipo de suelo.

La actividad antibacteriana del género *Rubus* fue evidenciada en la especie *Rubus urticaefolius* (De Paula, 2000), *Rubus liebmannii* (Cornejo, 2006) (Jiménez, 2012), *Rubus parvifolius* (Yongqing, 2012) y *Rubus sanguineus* (Zeidan, 2013).

Actualmente el desafío para los países ricos en biodiversidad es, vincular y convertir el conocimiento acerca de los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas y productos útiles, como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad (Lizcano, 2008).

En el caso de México, como país rico en biodiversidad, el empleo de las plantas con propiedades medicinales ha sido un recurso muy utilizado, sobre todo en

comunidades alejadas de las grandes ciudades, en el tratamiento de enfermedades. Un ejemplo de esto son las plantas conocidas en el Valle de México, en la región de los volcanes, tales como romero, ruda, santa maría, hinojo, ajeno, manzanilla, toronjil, mercadela, espinosillo, muiltle, laurel, gordolobo, árnica y como la zarzamora ocupada para el tratamiento de tos, disentería y algunas enfermedades causadas por hongos en recién nacidos.

Con base en lo anterior, con el fin de buscar alternativas para el aprovechamiento de los recursos biológicos y conocer el por qué del efecto terapéutico que se le atribuye a *Rubus liebmannii* (zarzamora). Esto fue el objetivo de este trabajo, en el cual se evaluó el efecto antimicrobiano de la *Rubus liebmannii*, frente a microorganismos patógenos del hombre, se comprobó que el fruto fue la parte que presentó mayor efecto inhibiendo el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigela flexneri*. La hoja también tuvo un efecto con *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis* y el tallo con *Bacillus subtilis*.

Por lo anteriormente expuesto se sugiere el uso de *Rubus liebmannii* como un buen agente antimicrobiano; y ser utilizado como agente terapéutico específicamente contra enfermedades tales como algodoncillo, catarro y disentería entre otras.

Para concluir, el trabajo consta de dos capítulos; en el primero se define que es un antimicrobiano, una prueba de sensibilidad, lo que es el metabolismo primario y secundario de las plantas, los métodos y lo que es un principio activo; en el segundo capítulo se define lo que es una planta medicinal, el empleo de las mismas en la época prehispánica, características botánicas de la planta de estudio y el registro del empleo de ésta en la Región de los Volcanes, Estado de México.

CAPÍTULO I

LA BÚSQUEDA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

1.1.- ¿Qué es un agente antimicrobiano?

Es un compuesto químico, natural o sintético, “que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos”. Los agentes que matan microorganismos se denominan *agentes –cida*, con un prefijo que indica el tipo de microorganismos que mata. Así, se tienen agentes bactericidas, fungicidas y virucidas. Un agente bactericida mata bacterias. Los agentes que no matan pero inhiben el crecimiento se denominan *agentes –estáticos*; así, se habla de agentes bacteriostáticos, fungistáticos y virustáticos (Madigan, 2006).

1.2.- Efecto de los agentes antimicrobianos sobre el crecimiento bacteriano

Se observan tres tipos de efectos cuando se añade un agente antimicrobiano a un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento: bacteriostático, bactericida y bacteriolítico. Se observa un **efecto bacteriostático** cuando se inhibe el crecimiento pero las células no mueren. Con frecuencia, los agentes bacteriostáticos son inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas. No obstante, dicha unión no es una unión fuerte y, cuando se disminuye la concentración del agente, el antimicrobiano se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento.

Los **agentes bactericidas** provocan la muerte celular pero no dan lugar a la lisis o ruptura de las células. Los agentes bactericidas son una clase de agentes químicos que generalmente se unen fuertemente a su célula diana² bacteriana y no se eliminan por dilución.

Por otro lado, los **agentes bacteriolíticos** provocan la muerte celular por lisis, la rotura celular se detecta por un descenso abrupto en el número de células. Dentro de los agentes bacteriolíticos se incluyen los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, como la penicilina, y los compuestos químicos que lesionan la membrana citoplasmática (Madigan, 2006).

² Se denomina así a cualquier célula que tiene un receptor específico que reacciona con una hormona, antígeno, anticuerpo, antibiótico u otra sustancia específica.

1.3.- Patogenicidad bacteriana

Es la capacidad de un microorganismo de producir una enfermedad. Los microorganismos capaces de causar enfermedades en circunstancias apropiadas se denominan patógenos (Koneman, 1999).

1.3.1.- Métodos para la detección de la sensibilidad a antimicrobianos

Son procedimientos cuyo objetivo principal es determinar si la etiología³ bacteriana es capaz de expresar resistencia a los agentes antimicrobianos posibles como opciones terapéuticas para manejar la infección (Forbes, 2009).

1.3.2.- Prueba de sensibilidad por difusión con discos

Prueba en la que tan pronto como el disco de papel impregnado de antibiótico toma contacto con la superficie húmeda del agar previamente inoculado, el agua se absorbe en el papel filtro y el antibiótico se difunde en el medio que lo rodea. La velocidad de extracción del antibiótico fuera del disco es mayor que su difusión hacia el interior del medio, de modo que la concentración inmediatamente adyacente al disco puede exceder a la del disco mismo. A medida que aumenta la distancia, hay una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico (gradiente de concentración) (Koneman, 1999).

Después de la incubación las placas se examinan en busca de como fue el desarrollo de los microorganismos y de cuál fue la concentración mínima inhibitoria (CMI). Después de la incubación, el diámetro del halo de inhibición alrededor de cada disco se mide en milímetros (Forbes, 2009).

1.3.3.- Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe por completo el desarrollo bacteriano de forma visible dentro del medio de cultivo. La CMI puede ser útil para establecer el nivel de resistencia de una cepa bacteriana determinada y tomar la decisión de usar ciertos agentes antimicrobianos (Forbes, 2009).

1.4.- Metabolismo de las plantas

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que las moléculas experimentan, para convertirse de unas a otras y que tienen lugar en un ser vivo. Estas reacciones, en su conjunto, no constituyen solo un fenómeno más dentro de lo que puede caracterizar a dicho ser vivo, sino que son la condición necesaria y

³ Parte de la medicina que estudia las causas de las enfermedades. *La etiología del cáncer.*

suficiente para que se pueda decir que está vivo. De forma general al metabolismo se le divide en metabolismo primario y secundario cuyos productos se nombran metabolitos primarios o secundarios.

1.4.1.- Metabolitos primarios de las plantas

Los metabolitos primarios son aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y que desempeñan las mismas funciones. La mayor parte del carbono, nitrógeno y energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos (Ávalos, 2009; Peña, 2001).

1.4.2.- Metabolitos secundarios de las plantas

Los metabolitos secundarios en plantas son compuestos de bajo peso molecular que las plantas sintetizan destinando una cantidad significativa del carbono asimilado y de energía para la formación de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos.

Difieren 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, 2009).

La química de los metabolitos secundarios es diferente de una planta a otra, pues precursores químicos comunes pueden conducir a resultados totalmente diferentes (Lizcano, 2008).

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas, participando en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y como atrayentes o repelentes de animales. Otros se identifican en los pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, juegan un papel esencial en la reproducción, al atraer insectos polinizadores, a los animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento para contribuir de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora al ser consumidos por herbívoros, actúan como repelentes, proporcionan a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes microorganismos patógenos; actúan como

pesticidas naturales, incluso, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como la competencia por el espacio de suelo, la luz, los nutrientes entre las diferentes especies de plantas, la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Ávalos, 2009; Sepúlveda, 2003).

Por otro lado, la distinción entre ambos tipos es difusa en ocasiones se tiene en cuenta que la biosíntesis de muchos de ellos comparten numerosos intermediarios que derivan de las mismas rutas metabólicas. Por lo tanto, la diferenciación entre metabolitos primarios y secundarios puede no ser del todo adecuada. Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono.

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Ávalos, 2009).

Actualmente se conocen aproximadamente 20, 000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química, son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides.

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios se da por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación. Esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de su estrategia de adaptación.

Se sabe que a un microorganismo patógeno o a insectos y vertebrados herbívoros, les resulta más difícil infectar o alimentarse de una población de plantas que individualmente contienen mezclas diferentes de metabolitos secundarios, que de una población con una mezcla homogénea de metabolitos secundarios.

Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el Ciclo de Krebs o la Vía del Shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de metabolitos secundarios puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también metabolitos secundarios que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su

redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico. La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico (Sepúlveda, 2003)

La gran cantidad de plantas con aplicaciones curativas tiene que ver con el proceso de evolución de la tierra. A lo largo de cientos de millones de años, en un proceso permanente de “carrera sin fin”, las plantas han producido y transformado, selectivamente, infinidad de defensas, fundamentalmente en la forma de compuestos químicos –muchos de ellos alcaloides- para impedir, escapar o reducir los efectos de cientos de miles de especies de herbívoros, principalmente insectos, reptiles, aves y mamíferos.

Las casi 260 mil especies de plantas vasculares conocidas por la ciencia, es decir, aquellas que han sido colectadas, catalogadas, nominadas científicamente y depositadas en algún herbario del mundo, son fundamentalmente desconocidas desde cualquier otro punto de vista. En otras palabras, sus características fisiológicas, químicas, sus requerimientos ecológicos, entre otros aspectos, se conocen en sólo 1 o 2 %.

Entre la inmensidad de compuestos químicos generados en estos eficaces -y baratísimos- laboratorios que son las plantas, los alcaloides tienen un lugar preeminente como defensa tóxica contra sus depredadores naturales. Estas sustancias tóxicas para los herbívoros, tienen efectos diversos en otras especies de animales, como es el caso notable de la especie humana.

Los alcaloides, aunque también otros grupos de sustancias químicas, afectan el comportamiento fisiológico del hombre de distintas maneras. Desde el agradable estímulo de la cafeína –en el café matutino-, a las violentas e impredecibles reacciones a las sustancias alucinogénicas –como la psilocibina, la mezcalina de los hongos o el peyote-, pasando por toda una gama de efectos terapéuticos como la digitalina o la codeína; o peligrosamente adictivos como la cocaína; o mortalmente tóxicos como la estricnina.

En la actualidad solo unos pocos metabolitos se utilizan de forma industrial, por lo que ha sido necesario generar opciones y alternativas de producción, enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponibles en el entorno, trabajando activamente en la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies que pueden tener aplicación en la industria (cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria (Lizcano, 2008).

1.5.- Extractos de plantas

Son preparados obtenidos por concentración parcial o total de los líquidos extractivos. Se pueden distinguir diferentes tipos de extractos según su concentración respecto a la planta original y según su consistencia. Se tienen

extractos fluidos, blandos y secos (Kuklinski, 2003). En éste trabajo se obtuvieron extractos vegetales de tipo blandos para su empleo en el método.

1.5.1.- Principales métodos extractivos

De acuerdo a lo mencionado por Kuklinski (2003) los principales métodos extractivos se clasifican de la siguiente forma (véase imagen 1):



Imagen 1.- Métodos extractivos en farmacognosia

- **Extracción mecánica:** Ésta técnica permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta, los cuales una vez extraídos se denominan jugo.
- **Destilación:** Se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga, lo cual permite la separación de componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles. Se suelen hacer destilaciones por arrastre de vapor o por hidrodestilaciones que facilitan la extracción de principios activos volátiles. La destilación permite obtener, por ejemplo, las esencias de las drogas. Es un método en el que se utiliza una fuente de calor, por lo que solo es aplicable a principios activos termoestables.
- **Extracción con gases en condiciones supercríticas:** Aquí se trabaja a presión y temperatura superiores a la presión y temperaturas críticas. Los gases que más utilizan son el dióxido de carbono y el butano. La extracción con gases es muy selectiva y es sencillo eliminar el gas extractor, pero también es costosa y difícil de encontrar las condiciones óptimas de presión y temperatura.
- **Extracción con disolventes:** Consiste en poner en contacto la droga con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben pasar de la droga al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. La extracción con disolventes es uno de los métodos que se emplea con más frecuencia para la obtención de principios activos.

Factores a tomar en cuenta en la extracción con disolventes:

- a) **Característica de la planta:** Una vez desecada la planta y con un grado de fragmentación adecuado para facilitar el máximo contacto entre los principios activos y el disolvente.
- b) **Naturaleza del disolvente:** Se toma en cuenta ésta característica cuando se realizan las extracciones con agua ó las mezclas hidroalcohólicas. El agua resulta un buen disolvente de muchos principios activos; por esa misma razón resulta generalmente poco selectivo. Algunos extractos de naturaleza polar se hidrolizan en agua. Los extractos acuosos tienen estabilidad poco duradera.
- c) **Temperatura:** El aumento de temperatura permite la extracción de principios activos por que aumenta la solubilidad en los disolventes pero a su vez puede favorecer la degradación de dichos principios activos. Se recomienda tener temperaturas controladas. En ningún caso se utilizan temperaturas elevadas para extraer principios activos termolábiles.
- d) **Tiempo de contacto entre la planta y el disolvente:** Este depende de la característica de la planta (dureza, grado de división, entre otras) y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, entre otros).
- e) **Control de la difusión celular:** Este se logra cuando el grado de división de la planta es adecuado y al renovar el disolvente. Cuando la planta está en contacto con el disolvente, se produce una difusión de los principios activos de la planta hacia el disolvente debido a que en la planta, la concentración del principio activo es superior a la concentración en el disolvente utilizado en la extracción. Esta difusión se produce hasta alcanzar el equilibrio (Kuklinski, 2003).

1.6.- Principio activo en plantas

Son moléculas que, producidas por el metabolismo de un organismo vegetal, se encuentran dotadas de una actividad farmacológica puntual y que generan en el organismo modificaciones en una o más de su células, y que pueden ser empleadas en la terapéutica (Hersch, 2000).

Puede ser una sustancia simple o compleja en dependencia de la ruta metabólica que haya dado su resultado a partir de la fotosíntesis.

La investigación científica ha permitido descubrir una variedad de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos, los mucílagos, las gomas y los taninos. Estos principios activos poseen estructuras químicas que los diferencian unos de otros. También se les llama grupos funcionales. Estos grupos funcionales le proporcionan a la molécula características químicas específicas.

Con base en lo anterior se planteó determinar la presencia de los grupos funcionales presentes en los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora) mediante un estudio espectrofotométrico en infrarrojo.

1.7.- Estudio espectrofotométrico en infrarrojo

Este análisis se emplea para determinar la presencia de grupos funcionales específicos en una mezcla de reacción. La información obtenida desde un espectro en el infrarrojo permite la identificación de los grupos funcionales presentes en las moléculas (Rius, 2007).

CAPITULO II

EL USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA

2.1.- ¿Qué es una planta medicinal?

Se define a una planta medicinal como aquel vegetal en cuyas partes contengan alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos (Kuklinski, 2003).

El empleo de las plantas con fines medicinales, es probablemente tan antiguo como el hombre. Tanto en los países en vías de desarrollo, donde la fitoterapia constituye la forma de tratamiento más económica y arraigada en la cultura popular, como en los altamente industrializados, las plantas son fuente de obtención de medicamentos.

En años recientes, ha surgido un renovado interés en todo el mundo por estudiar los productos naturales derivados de vegetales desde un punto de vista científico, por su aplicación en áreas tan importantes como la medicina, la agricultura y la contaminación ambiental entre otras. Así, de las 200 mil a 400 mil variedades que se calcula existen en el planeta, y de las cuales han sido estudiadas desde el punto de vista farmacológico tan solo un 10%, presenta el reto de obtener los principios activos y preservar esta información, aun para aquellas que se encuentran en peligro de extinción.

El almacén químico que representan las plantas está muy inexplorado y es casi inagotable. Aproximadamente 120 medicinas de uso común tienen como base principios activos fitoquímicos y estos principios han sido extraídos de un poco menos de cien especies vegetales. Por tal motivo las ciencias farmacéuticas y médicas han utilizado una mínima fracción del potencial químico presente en las plantas (Lara, 1996).

2.2.- Plantas medicinales en la época prehispánica

Los conocimientos acerca de las plantas medicinales, son muy antiguos y empíricos, ya que datan de épocas muy anteriores al descubrimiento de América. Los indígenas, en virtud de su íntimo contacto con la Naturaleza y por una experiencia prolongada, habían adquirido amplios conocimientos sobre las virtudes curativas de las plantas y las sabían aprovechar con sorprendente acierto (Martínez, 2005).

2.2.1.- Códice De la Cruz-Badiano

El *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Tratado sobre *hierbas medicinales indígenas*) es el primer libro escrito por indígenas, y elaborado en el Nuevo Mundo, trata sobre plantas curativas en Mesoamérica. El *Libellus* documenta el encuentro entre los remedios autóctonos mesoamericanos con la medicina europea. Hoy, el *Libellus* es la base para entender el papel de las plantas medicinales mexicanas entre las culturas del pasado, así como en la sociedad contemporánea.

El *Libellus* fue creado por una razón práctica y fue dirigido a la corona española. El Real Colegio de Santa Cruz en Tlatelolco (encabezado por el fraile Jacobo de Grado), se estableció para educar a los niños de la nobleza de la sociedad mexicana después de la conquista de México, que en ese entonces, afrontaba una crisis sanitaria y financiera. Las enfermedades habían reducido a la población indígena y habían amenazado a los estudiantes; además, el nuevo colegio necesitaba el mantenimiento apropiado.

Esto requirió de más financiamiento por parte de las autoridades españolas. Una vez concluido el libro (julio de 1552), Francisco de Mendoza (hijo del virrey de Nueva España, Antonio de Mendoza) el *Libellus* fue presentado a la corona española como prueba del alto nivel intelectual de los indígenas en la Nueva España. Un año más tarde, el financiamiento oficial para el colegio fue autorizado. Un objetivo adicional del hijo del virrey de Nueva España fue obtener concesiones sancionadas por la corona, para comercializar plantas medicinales americanas.

Martín De la Cruz, fue médico indígena de prestigio, *ticitl*, de Santiago Tlatelolco, fue llamado para atender a los estudiantes que estaban enfermos en el Real Colegio de Santa Cruz. Él se ganó la confianza del virrey de Nueva España y de su hijo, quienes lo comisionaron para redactar un texto sobre remedios locales con plantas medicinales. De la Cruz, que era un hombre sin educación institucional pero con gran experiencia, en sus discursos mencionaba ejemplos de las enfermedades y los remedios desde la perspectiva del indígena mexicano, que se registró en náhuatl.

Juan Badiano (1484), fue profesor del Real Colegio de Santa Cruz, nativo de Xochimilco, con conocimientos sobre la medicina tradicional y con una educación formal en latín y español, colaboró con De la Cruz en la traducción de la información al latín. Los artistas nativos, denominados *tlacuilos*, hicieron las ilustraciones de las plantas.

La información del *Libellus* fue organizada por enfermedades en 13 capítulos. El sistema médico indígena clasifica anatómicamente las enfermedades desde la cabeza a los pies. Las descripciones de algunas enfermedades tienen que ver con la cosmovisión mexicana. Cada planta se encuentra sobre figuras de varias formas y colores que representan propiedades específicas, en la mayor parte de los casos, su hábitat ecológico.

El *Códice de la Cruz-Badiano* contiene 224 nombres de plantas, de las cuales contiene 185 ilustraciones. Desde la década de los treinta, varios investigadores, principalmente de México y Estados Unidos, han propuesto las identificaciones taxonómicas de más de la mitad de las plantas, con base en los caracteres vegetales y reproductivos incluidos en las ilustraciones, sus nombres indígenas y la bioactividad implícita en su aplicación medicinal.

Entre las plantas tratadas en el *Libellus* predominan las de las familias botánicas *asteraceae* (margaritas) y *fabaceae* (leguminosas), un patrón encontrado en las floras medicinales en todo el mundo.

Aproximadamente el 60% de las especies identificadas crece en la Cuenca de México, mientras que las otras son nativas de otras partes del país.

A continuación se presenta una breve descripción de la foja 54 del *Libellus* donde se describe el uso de algunas plantas “contra la fetidez de los enfermos” y donde una de ellas corresponde al género *Rubus* (zarzamora).

Contra la fetidez de los enfermos: Este mal olor se quita si se unge el cuerpo con el jugo de las hierbas *ayauhtonan ixihuah*, *papaloquilitl*, *xiuhehecapahtli*, bien molidas en agua, más el de las ramas de pino, y de las flores del *ocoxochitl*, *tonacaxochitl*, *totaloctzin* y también espigas (véase imagen 2) (De la Cruz, 1996).



Imagen 2.- Foja 3 del *Códice De la Cruz-Badiano*

Totoloctzin [cabeza inclinada]. Nombre científico: *Rubus pumilus*. Nombres comunes actuales: zarzamora, zarza. Familia botánica: *Rosaceae*. El uso consignado en el código contra el hedor de los enfermos se ha mantenido. Actualmente no se ha encontrado ningún uso medicinal para esta especie, pero otras especies de zarzamora se siguen empleando para el mal olor y para las ronchas del sarampión. También se emplean para la diarrea, las anginas, el dolor de oído, la inflamación y la diabetes.

Tonacaxochitl [flor de nuestra carne, flor de nuestro sustento]. Planta aún no identificada.

Ayauhtonan [nuestra madre de la niebla]. Nombre científico. *Ipomopsis pinnata*. Nombres comunes actuales: gilia. Familia botánica: *Polemoniaceae*. Es una planta herbácea perenne, con tallo ramificado desde la base y densamente pubescente. Las hojas están finamente en segmentos lineares. Las flores están dispuestas en inflorescencias y son cortamente pedunculadas, con corola en forma de trompeta, lóbulos cortos de color blanquecino o amarillento, a menudo con manchas moradas en la garganta; los estambres por lo general no sobresalen de la corola. Se distribuye de los Estados Unidos a México. Habita en climas de cálido a templado. Crece en bosques templados, matorrales y pastizales, y a las orillas de los caminos o en hábitats perturbados. El uso consignado en el código contra el hedor de los enfermos ha desaparecido. Actualmente no se ha encontrado ningún uso medicinal para esta especie, aunque otra especie se usa para matar peces (Linares y Bye, 2013).

2.3.- Propiedades y efectos de las plantas medicinales

Hoy en día se sabe que las plantas contienen principios activos los cuales son responsables de su eficacia medicinal. La importancia de las plantas medicinales surge en cuanto a si es medicinal o no, luego que parte de la planta (raíz, hoja, flor, fruto, rama, corteza o tallo) posee efecto terapéutico, y por supuesto saber que dosificación es correcta para no causar una intoxicación, o trastornos no deseados e incluso la muerte. Ciertas plantas producen efectos curativos en el humano y los animales, el problema es la dosificación, debemos conocer cuál es el límite entre lo que cura y lo que mata antes de utilizarla sobre un ser vivo (Schauenberg y Paris, 1980).

Los productos naturales son una fuente muy rica de productos bioactivos prototipo para la obtención de fármacos con actividad biológica de gran potencia y baja toxicidad. Como resultado del estudio de las plantas medicinales de uso tradicional, es posible obtener algunas moléculas bioactivas desconocidas hasta la fecha, que poseen acción curativa sobre algunas de las enfermedades más frecuentes en nuestro país. La caracterización de estos principios activos permitirá descartar aquellas que resulten muy tóxicas o cuyos efectos secundarios las hagan inapropiadas para el tratamiento.

La lista de compuestos químicos vegetales, que ofrecen respuesta a severos problemas de salud pública, es muy larga. Está en esa lista el muy conocido y referido ejemplo de la quinina que salvo a cientos de miles de vidas en la primera mitad del siglo XX y que ahora, sintetizada, mantiene libre de la malaria a muchas zonas extratropicales. O la salicina, base del compuesto activo de la aspirina, aislada de los sauces europeos, quizá el medicamento universalmente más administrado e ingerido en el mundo. O el taxol, alcaloide extraído de una especie de *Taxus* del noreste de Estados Unidos, que ha sido exitosamente utilizado en el tratamiento de fases avanzadas de cáncer ovárico (Lara, 1996).

2.4.- Características generales de la zarzamora

La zarzamora es arbusto ruderal que crece preferentemente en lugares templados y fríos de la República, y es bien conocido especialmente por sus frutos, de sabor agradable y de color morado, y con lo que se prepara un vino muy estimado (Cabrera, 1986).

Se da este nombre a varias especies de *Rubus* (*Rosaceae*) cultivadas y silvestres. Son plantas espinosas tendidas o arbustivas de hojas simples o compuestas; flores grandes; fruto compuesto de numerosas drupas rojas o negras y jugosas. Hay en México unas 28 especies (Martínez, 1979).

2.4.1.- Características botánicas de la zarzamora

Receptáculo cóncavo. Cáliz de 5 divisiones erguidas o abiertas. Pétalos 5. Estambres infinitos, con los filamentos delgados. Carpelos numerosos, libres, con 2 óvulos péndulos cada uno. El fruto está formado por numerosas drupillas, sobre un receptáculo subgloboso. Hierbas o arbustos sarmentosos, cubiertos de agujones, de hojas simples, lobuladas o compuestas y flores solitarias o cimoso-paniculadas (Sánchez, 1969).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Rubus liebmannii</i>	
• Reino: <i>Vegetal</i>	• Familia: <i>Rosaceae</i>
• Clase: <i>Angiospermae</i>	• Género: <i>Rubus</i>
• Subclase: <i>Dicotyledoneae</i>	• Especie: <i>liebmannii</i> Focke
• Orden: <i>Rosae</i>	

Tabla 1.- Clasificación taxonómica de *Rubus liebmannii*.

México posee una gran diversidad de climas y culturas. Cada cultura ha desarrollado un conocimiento específico de las plantas de la región. Sin embargo, por la gran interacción actual entre las distintas regiones del país, la herbolaria contemporánea ha dejado de ser regional. Existen vendedores ambulantes que,

sin saberlo, contribuyen a la distribución de este conocimiento al llevar plantas de una región a otra (Linares, 2005).

Los estudios recientes han llevado a la conclusión de que ciertas plantas no tienen las virtudes curativas que se les atribuían, puesto que han fracasado al someterlas a la experimentación clínica.

Los fracasos obtenidos dependen de que no se hayan identificado exactamente las plantas que los indígenas usaban ni se ha aplicado en la forma en que ellos lo hacían, pues un medicamento que los indios empleaban con buen éxito por la vía bucal, se ha pretendido de igual eficacia por la vía intravenosa. En otras ocasiones, al hacer la experimentación con determinados animales, se ha encontrado que tal planta no es tóxica a ciertas dosis, y luego se ha generalizado, siendo así que una misma planta puede tener diferentes efectos en distintos organismos. Por esas razones resultan aventuradas y nada prudentes las conclusiones de algunos autores y de no pocos médicos, que niegan enfáticamente las virtudes curativas de algunas plantas, solo por que fracasaron en los casos y circunstancias en que ellos las usaron (Martínez, 2005).

2.4.2.- Características de *Rubus liebmannii* Focke (zarzamora)

Arbusto de 1 a 4 m de alto, semitrepador, con espinas cortas, algo curvadas, pubescencia de pelos largos y cortos, a veces ausentes en tallos maduros, especialmente densa en las partes jóvenes (inclusive hojas), donde a veces se presentan pequeñas glándulas rojas sésiles o cortamente estipitadas; estípulas setáceas, de 7 a 10 (a 15) mm de largo; pecíolos pubescentes, espinosos, de 4 a 6 cm de largo; hojas por lo general trifolioladas, a veces simples o 5-folioladas; folíolos ovados a lanceolados, en ocasiones con tendencia a lobularse, de 3 (4) a 10 (15) cm de largo por 2 a 6 (10) cm de ancho, acuminados, borde con dientes irregulares, doblemente aserrado, láminas por lo general poco pubescentes en ambas caras, pero a veces llegando a ser blanco-tomentosas en el envés; peciolo del folíolo terminal de 2 a 3 cm de largo, folíolos laterales más chicos y subsésiles; ramas florales densamente pubescentes, con espinas muy pequeñas, curvadas; cimas umbeliformes cortas, terminales y axilares, por lo común de 1 a 6 flores, pedicelos y cálices tomentosos y con glándulas rojizas sésiles o cortamente estipitadas; sépalos extendidos o reflejos, ovado-lanceolados, acuminados, de 5 a 8 mm de largo; pétalos blancos (a veces color de rosa en ejemplares secos), ovales, de más o menos el mismo largo que los sépalos; fruto agregado globoso-aplastado hasta de 1.5 cm de diámetro, negrozco; drupillas numerosas, tomentosas. Se encuentran a una altitud de 2300 a 3000 m. Se ubica en matorral, encinar, bosque de abies y bosque mesófilo (Rzedowski, 1979).

2.5.- Registro del empleo de *Rubus liebmanni* (zarzamora) en la Región de los Volcanes, Estado de México.

En un trabajo de compilación titulado “Nombre común y usos de las plantas medicinales de San Juan Tepecoculco, municipio de Atlautla de Victoria, Estado de México” se registran los siguientes usos a la especie de estudio:

Rubus liebmanni Focke.

“Mora corriente”

“Temacate corriente”

“Mora chica”

“Mora negra”

Usos:

a) Disentería:

- Raíz de mora (chica o negra), media raíz si es grande, tres hojas de lantén en medio litro de agua. Hacer la cocción, endulzar poco y dar cada tres horas, 250 mL si es adulto y una copita en niños.
- En cocción los cogollos (hojas jóvenes) de nogal, jarilla, durazno, mora (temacate corriente), membrillo, flor o fruto.
- Planta de lantén, flor o fruto de granada, pimpinela y cogollos (hojas jóvenes) de mora, en cocción.
- Fruto de membrillo, planta de lantén, raíz de mora con azúcar: tomar en cocción. Tomar como agua de tiempo.
- Planta de lantén, raíz de mora, cáscara de membrillo, ramas de lenteja en cocción.
- Cogollo (hojas jóvenes) de mora corriente, fruto de membrillo en cocción.

b) Disentería fría o caliente:

- Fruto u hojas de granada, pimpinela, cogollos (hojas jóvenes) de mora corriente, 2 flores de cempoazúchitl, hierba del ciervo, lantén y ramas de muitle, rajas de canela, si las plantas están secas se utiliza lo que agarren los dedos de cada planta. Todo esto en cocción.

c) Cuando masca mucho el vientre (intuertos o contracciones uterinas):

- Hacer una cocción con raíz de bretónica y hueso de aguacate y cuando la persona está muy mal, agregar cogollos (hojas jóvenes) de jarilla o nogal, flor o fruto de durazno y ramas de temacate corriente (mora) (Jiménez, 1994).

OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora) y su acción sobre algunos microorganismos patógenos al hombre, a partir del estudio de cada una de las partes de *Rubus liebmannii* (zarzamora), para determinar su actividad antimicrobiana.

Específicos

- Realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora) sobre *Streptococcus B-hemolítico*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* y *Candida stellatoidea* para determinar cuál de ellas presenta la mejor respuesta.
- Identificar qué parte de *Rubus liebmannii* (zarzamora) (tallo, hoja y fruto) tiene mayor efecto inhibitorio sobre los diversos agentes patógenos.
- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias a las que el extracto presentó actividad antimicrobiana.
- Calcular el porcentaje de mortalidad en *Artemia salina* para probar la toxicidad del extracto.
- Identificar los grupos funcionales presentes en el extracto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) utilizando la técnica de espectroscopia de IR-FT.

JUSTIFICACIÓN

Las plantas, por su diversidad y riqueza en metabolitos secundarios, proporcionan una posible fuente de sustancias con actividad inhibitoria ante determinados microorganismos. Es por esto que su estudio es importante para la obtención de fitofármacos de con amplia efectividad y toxicidad reducida.

En nuestro país las plantas medicinales constituyen una de las formas más económicas para el tratamiento de las enfermedades y que plantean la posibilidad de incrementar la autonomía de las comunidades en cuanto a la dependencia de los fármacos de síntesis.

Por tal motivo este trabajo tiene el propósito de coadyuvar al uso terapéutico de *Rubus liebmannii* (zarzamora), a partir de conocer el efecto de las concentraciones mínimas inhibitorias del extracto de hoja, tallo y fruto, frente a microorganismos patógenos del hombre.

HIPÓTESIS

El empleo del extracto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) presentará efecto antimicrobiano en los microorganismos *Streptococcus B-hemolítico*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella flexneri* y *Candida albicans*, *Candida stellatoidea* debido a que los extractos vegetales contienen grupos funcionales capaces de actuar como agentes antimicrobianos.

MÉTODO

El método se realizó en tres fases: gabinete, campo y laboratorio.

El trabajo de gabinete consistió en la obtención y procesamiento de información, selección y uso de los diferentes métodos para la extracción de los principios activos, el análisis de resultados y la elaboración del trabajo escrito final.

Área de colecta

El trabajo de campo se realizó en el municipio de Tepetlixpa, Estado de México, con coordenadas geográficas Latitud N 19° 0' 2"; Latitud Oeste 98° 49' 04"; tiene una altitud en sus partes más altas de 2,600 m y de 1,600 m en las más bajas, la cabecera municipal está a una altitud de 2,315 m. Limita al norte con el municipio de Ozumba, al sur con Atlatlahucan (Morelos), al este con Ozumba y al oeste con Juchitepec y Totolapan (Morelos).

Para realizar el muestreo y conocer las características físicas y químicas del suelo donde crece *Rubus liebmannii* (zarzamora), se tomó una muestra compuesta la cual se realizó en un área de 10 x 10 m donde se tomaron 10 submuestras de diferentes puntos con una distancia de 1 m entre ellas, con la finalidad de obtener una muestra compuesta de aproximadamente 1 kg, a una profundidad de 0 a 30 cm (Jackson, 1964).

Para la parte de laboratorio se realizaron los análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo mediante los siguientes métodos (véase tabla 2).

Pruebas	Técnica	Referencia
FÍSICAS		
Densidad Aparente	Por Probeta	Gandoy, 1991
Densidad Real	Por Picnómetro	NOM 021-RECNAT-2000
Textura	Densímetro de Bouyoucos	NOM 021-RECNAT-2000
QUÍMICAS		
pH potencial	Potenciómetro	NOM 021-RECNAT-2000
Conductividad Eléctrica	Por Conductímetro	NOM 021-RECNAT-2000
Materia Orgánica	Método Walkley y Black	NOM 021-RECNAT-2000

Tabla 2.- Propiedades físicas y químicas del suelo en el que crece la especie estudiada.

Posteriormente se realizó una colecta de muestras vegetales de fruto, hoja, tallo de *Rubus liebmannii* (zarzamora) y una parte completa de la misma para su herborización e identificación.

Una vez herborizada e identificada la planta se colocaron las partes de la planta a temperatura ambiente de preferencia en lugares frescos y secos, evitando la humedad, el contacto con el aire y el calor (Ara, 1994).

Posteriormente se realizó una extracción hidroalcohólica de acuerdo a lo descrito por la Farmacopea de los Estado Unidos Mexicanos.

Tanto hojas, tallos y frutos, se pesaron en una balanza granataria, posteriormente se colocaron en frascos color ámbar y se agregó el alcohol hasta tapar por completo a cada una de las partes de *Rubus liebmannii* (zarzamora) midiendo el volumen de alcohol utilizado. Se taparon y etiquetaron los frascos y se colocó el nombre científico de la planta, la parte a extraer, la fecha de elaboración y se guardaron en un lugar oscuro para evitar que la luz descompusiera o modificara la composición química del extracto. Se dejaron a temperatura ambiente, durante 14 días, agitando una vez al día los frascos.

Después de 14 días, se continuó con la filtración del extracto, se utilizó papel filtro estéril, el líquido se guardó en un frasco de color ámbar y finalmente se etiquetó (Villar, 1999).

Para la obtención del extracto seco se evaporó el alcohol mediante el rotavapor, utilizando una canastilla de calentamiento a 60 °C a una presión de vacío de 10^{-4} bares, para posteriormente pesarlo en una balanza analítica (Redmore, 1981).

Las diferentes concentraciones del extracto de cada parte de la planta, se preparó pesando en la balanza analítica 30, 60 y 90 mg de extracto. Posteriormente se añadió 1 mL de alcohol a cada concentración, se homogeneizó y por último se guardó en frascos estériles de color ámbar, en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

Así mismo, se perforó el papel filtro Whatman n° 41 de tamaño estandarizado de 0.6 mm, y después se colocó en un tubo de ensaye y se esterilizaron, con el fin de preparar los sensidiscos.

Se colocaron los sensidiscos sobre una caja petri y se añadieron las diferentes concentraciones del extracto previamente preparado, impregnando de manera homogénea a cada sensidisco, con un testigo, al cual solo se añadió etanol (Levinson y Ernest, 1992).

Diseño experimental

El diseño experimental consistió de 4 tratamientos, 5 repeticiones y 12 cepas de microorganismos del cepario de la FES Zaragoza (véase tabla 3): los 4 tratamientos corresponden a las concentraciones de los extractos y el testigo, los cuales fueron identificados como $T_1= 30 \text{ mg mL}^{-1}$, $T_2= 60 \text{ mg mL}^{-1}$, $T_3= 90 \text{ mg mL}^{-1}$ y $T_4= \text{testigo}$. Se realizaron 5 repeticiones, para cada microorganismo.

MICROORGANISMOS	
HONGOS	BACTERIAS
<i>Candida albicans</i> <i>Candida stellatoidea</i>	<i>Streptococcus B-hemolítico</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigela flexneri</i> .

Tabla 3.- Cepas utilizadas en la evaluación de propiedades antimicrobianas de *Rubus liebmannii*.

Los medios de cultivo utilizados son: agar Mueller Hinton para bacterias y agar dextrosa Sabouraud para hongos (Bailón y col, 2005; Delaat, 1985).

Posteriormente las cepas microbianas fueron activadas, transferidas e incubadas en un nuevo medio de cultivo correspondiente a hongos y bacterias.

La transferencia de colonias de bacterias y hongos se hizo con una asa bacteriológica, a un tubo preparado con 1 mL de solución salina (NaCl 0.1%), para igualar la turbidez del tubo uno de la escala de Mc Farland, que indica la presencia de 3×10^8 UFC/mL (Unidad Formadora de Colonias), siendo éste el inóculo.

Los medios de cultivo para hongos o bacterias fueron esterilizados en autoclave a 120 libras por 20 minutos, posteriormente se adicionaron aproximadamente 15 mL en las cajas petri, se dejaron enfriar y se agregó el inóculo en el medio de cultivo, se homogenizó y se dejó solidificar (Granados y Villaverde, 1998; Bailón y col, 2005).

También se hizo una prueba de sensibilidad microbiana para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Koneman, 1999).

También se realizaron pruebas de toxicidad con *Artemia salina*; para ello se preparó una solución salina acuosa al 3% utilizando sal de mar. Se tomaron 90 mL de esta solución y se vertieron en un frasco estéril, posteriormente se colocaron 100 *artemias*.

En otro frasco estéril se colocó la concentración mínima inhibitoria del extracto seco de cada parte de la planta, y se agregaron 10 mL de agua destilada. Se agitó hasta que se homogenizó la solución. Posteriormente se agregó este en el frasco con *artemias*. Se realizaron 5 repeticiones para cada concentración mínima inhibitoria de cada estructura incluyendo al testigo, en la cual solo se agregó la solución salina y *artemias*.

Se corroboraron los resultados a las 24 y 48 horas y se anotó la proporción de *artemias* muertas en ese tiempo.

Posteriormente calculó la concentración letal media (CL 50), mediante el porcentaje de mortandad después de 48 horas (Mata, 2000; Payrol, 2001; Castro, 2004; Martínez, 2004).

$$\% M = \frac{\text{Artemias muertas en el extracto}}{\text{Artemias vivas en el blanco}} * 100$$

Pruebas de espectroscopia de infrarrojo

Para realizar esta prueba, se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo con ecuaciones transformadas de Fourier (IR-FT), de la marca Perkin Elmer, modelo 1600 del Laboratorio de Espectroscopia de la FES Zaragoza. Se colocó 0.1 g de extracto de hoja, tallo y fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) sobre un portaobjetos, se mezcló con KBr, se corrió y se interpretó con ayuda de tablas de correlación para conocer la presencia de grupos funcionales (Simón y Clero, 1970; Rubio y Segade, 1985).

Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis estadístico, realizando un Análisis de Varianza, posteriormente una Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95% ($p\text{-value} \geq 0.05$), la cual comparó las medidas de los diferentes tratamientos, para ello se utilizó el programa estadístico *StatGraphics* Versión Centurión XXI (Reyes, 1982; Cervantes, 2006).

RESULTADOS

Actividad antimicrobiana de los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora).

En la tabla 4 se presenta el concentrado de la respuesta de los extractos de *Rubus liebmannii* frente a los 14 microorganismos estudiados.

MICROORGANISMOS	Actividad antimicrobiana de <i>Rubus liebmannii</i>													
	Hoja			Tallo			Fruto							
	Concentración mg mL ⁻¹													
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	120	30	60	90	120
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida stellatoidea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Corinobacterium xerosis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Streptococcus B-hemolítico</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+)Si hubo actividad, (-) no hubo actividad

Tabla 4.- Bacterias y hongos vs los extractos de tallo, hoja y fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora).

A partir de estos resultados se muestra que existió actividad antimicrobiana de todos los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora) frente a la mitad de los microorganismos estudiados, siendo el extracto de fruto el que mostró la mejor

respuesta a todas las concentraciones. Mientras que el extracto de tallo fue el que mostró menor actividad antimicrobiana a partir de 30 mg mL⁻¹ vs *Streptococcus pyogenes*.

En la tabla 5 se presenta de manera resumida el efecto de los extractos de *Rubus liebmannii* frente a los microorganismos con los cuales existió respuesta a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.

MICROORGANISMOS	Concentración mg mL ⁻¹			
	30	60	90	120
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FHT			
<i>Corinobacterium xerosis</i>	F		H	
<i>Bacillus subtilis</i>		F		
<i>Enterococcus faecalis</i>				F
<i>Streptococcus mutans</i>				F
<i>Shigella flexneri</i>				F
<i>Pseudomona aeruginosa</i>				F

Tabla 5.- Microorganismos y concentraciones a las que se registro actividad antimicrobiana para el fruto (F), hoja (H) y tallo (T) de *Rubus liebmannii* (zarzamora).

A partir de estos resultados se observa que existió una mayor sensibilidad con el extracto de hoja, tallo y fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Streptococcus pyogenes* a una CMI de 30 mg mL⁻¹; seguido con *Corinobacterium xerosis* con el extracto de hoja y fruto a 90 mg mL⁻¹ y 30 mg mL⁻¹ respectivamente. Por último se puede mencionar que existió efecto con el extracto de fruto a 60 mg mL⁻¹ vs *Bacillus subtilis* y a 120 mg mL⁻¹ vs *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Shigella flexneri* y *Pseudomona aeruginosa*.

Con respecto a las propiedades físicas y químicas del suelo en el que crece *Rubus liebmannii*, en la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos.

Pruebas	Resultados
Físicas	
Densidad Aparente	0.98 (g/cc)
Densidad Real	2.07 (g/cc)
Espacio Poroso	52.6%
Clasificación Textural	Franco-arenosa
Porcentaje de Arena	64%
Porcentaje de Limo	32%
Porcentaje de Arcilla	4%
Químicas	
pH	6.02
Conductividad Eléctrica	0.6 mS
Materia Orgánica	8.2 %

Tabla 6.- Concentrado de las propiedades físicas y químicas del suelo en el cual crece *Rubus liebmannii* (zarzamora).

A partir de estos resultados se puede decir que la clase textural del suelo fue franco-arenosa; con un porcentaje de espacio poroso de 52.6 % por lo que existe una buena aereación y un buen drenaje, facilitando con ello el crecimiento radicular. La cantidad de arenas presentes en el suelo fue del 64 %, lo que facilita el escurrimiento del agua hacia los estratos inferiores que será compensada con la cantidad de materia orgánica (8.2%). El pH fue de 6.02 considerándose al suelo moderadamente ácido.

Con lo que respecta al rendimiento del extracto obtenido de a especie estudiada, en la tabla 7 se presenta lo siguiente:

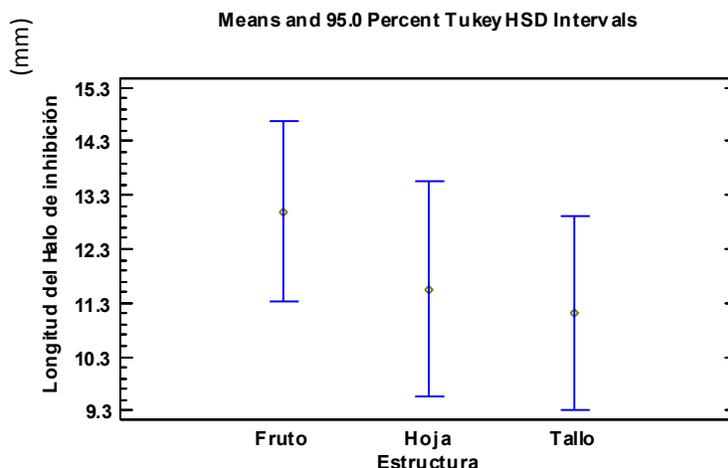
<i>Rubus liebmannii</i>	Peso seco (g)	Volumen tintura (mL)	Peso extracto (g)	Rendimiento extracto (%)
Fruto	415	970	37.84	9.03
Tallo	142	1120	3.89	2.73
Hoja	73.1	780	5.54	7.57

Tabla 7.- Rendimiento del extracto semisólido de *Rubus liebmannii* (zarzamora).

Con base en lo anterior, se puede decir que la estructura que mostró el mayor rendimiento fue el fruto con 9.03 %; mientras que el menor rendimiento fue para el tallo con 2.73 %.

Para corroborar estadísticamente los resultados obtenidos de los diferentes extractos a diferentes concentraciones de *Rubus liebmannii*, se hizo una prueba de Tukey para confirmar los resultados presentados en párrafos anteriores.

En la tabla 1 donde se muestra la respuesta de las estructuras del extracto analizadas se procedió a verificar estadísticamente cuál de estas respuestas era la mejor. Para ello se hizo un análisis de varianza para ver si existía alguna diferencia estadística significativa entre las estructuras analizadas, y posteriormente se utilizó una Prueba de Tukey. Para ello, en la grafica 1 se muestra la respuesta de los extractos de tallo, hoja y fruto de *Rubus liebmannii* vs *Streptococcus pyogenes*.



Gráfica 1.- Diámetro promedio entre las diferentes estructuras del extracto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Streptococcus pyogenes*.

A partir de lo anterior, se puede afirmar que el extracto de fruto fue el que presentó el mayor halo de inhibición (con aproximadamente 12.8 mm) y el extracto de tallo el que presentó un halo de inhibición menor (aprox. 11.1 mm).

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tallo	12	11.1125	1.01947	X
Hoja	11	11.56	1.14737	X
Fruto	14	13.0017	0.949072	X

Tabla 8.- Prueba estadística de homogeneidad entre tratamientos vs *Streptococcus pyogenes*.

Buscando contrastar el mayor efecto entre los tratamientos, en la tabla 8 se muestra que no existieron diferencias estadísticas significativas entre los extractos de hoja, tallo y fruto de *Rubus liebmannii* vs *Streptococcus pyogenes*, ya que en las pruebas de sensibilidad se observó que hubo respuesta para todos los extractos y a todas las concentraciones; sin embargo, contrastando el tamaño de los halos de inhibición, se puede concluir que el extracto del fruto tuvo el mejor efecto sobre *Streptococcus pyogenes*. Esto se corrobora en la imagen 3 en donde se muestra los halos de inhibición del fruto.

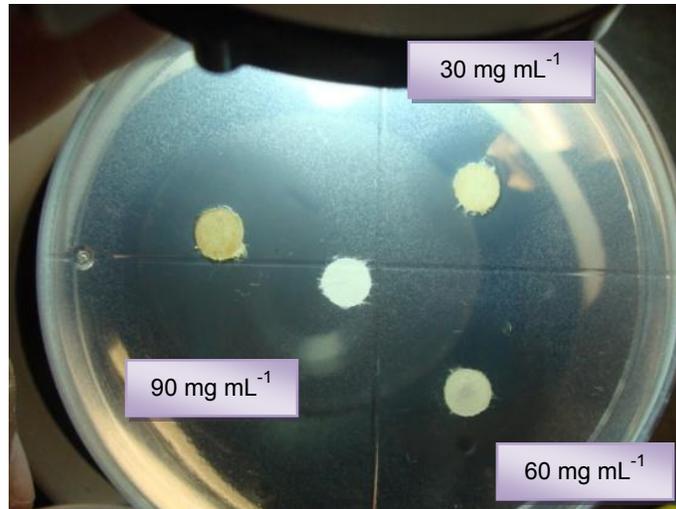
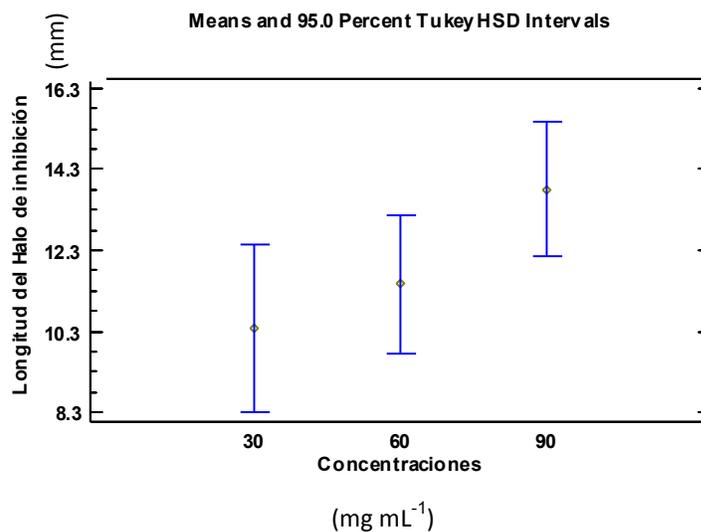


Imagen 3.- Halos de inhibición del extracto del fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Streptococcus pyogenes*.

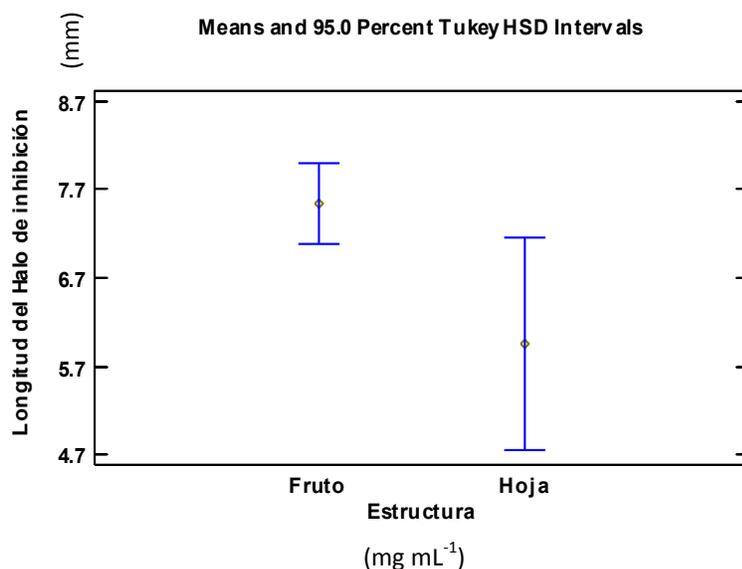
Al no existir diferencias estadísticas significativas de los extractos se procedió a verificar si existían diferencias entre las concentraciones de los tres extractos. El análisis estadístico realizado mostro que tampoco existieron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones. Esto se puede verificar en la gráfica 2.



Gráfica 2.- Diámetro promedio entre las diferentes concentraciones del extracto de fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Streptococcus pyogenes*.

Con respecto a la respuesta de las estructuras del extracto analizadas se siguió el mismo procedimiento estadístico y de análisis hecho para *Streptococcus pyogenes*, ahora para *Corynebacterium xerosis*. Para ello, en la grafica 3 se

muestra la respuesta de los extractos de tallo y fruto de *Rubus liebmannii* vs *Corynebacterium xerosis*, no mostrando el resultado del extracto del tallo ya que no hubo efecto inhibitorio. A continuación se muestra la respuesta de los dos extractos.



Gráfica 3.- Diámetro promedio entre las diferentes estructuras del extracto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Corynebacterium xerosis*.

A continuación se muestra la tabla 9 en donde se observa que hay homogeneidad entre los grupos, evidenciando que no existen diferencias estadísticas significativas.

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Hoja	3	5.96333	0.793067	X
Fruto	15	7.53667	0.299751	X

Tabla 9.- Prueba estadística de homogeneidad entre los tratamientos vs *Corynebacterium xerosis*.

A partir de lo anterior se puede afirmar que el extracto de fruto fue el que presentó el mayor halo de inhibición (aproximadamente 7 a 8 mm); mientras que el de hoja fue el que tuvo un halo de inhibición menor (aprox. 4.7 a 7.1 mm). En la imagen 4 se observa que al aumentar la concentración se incrementa el tamaño del halo de inhibición para el fruto de *Rubus liebmannii* vs *Corynebacterium xerosis*.

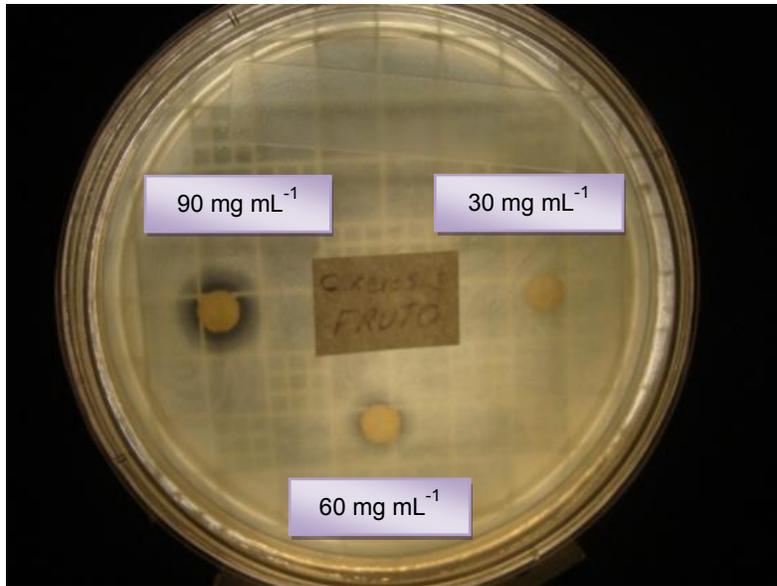
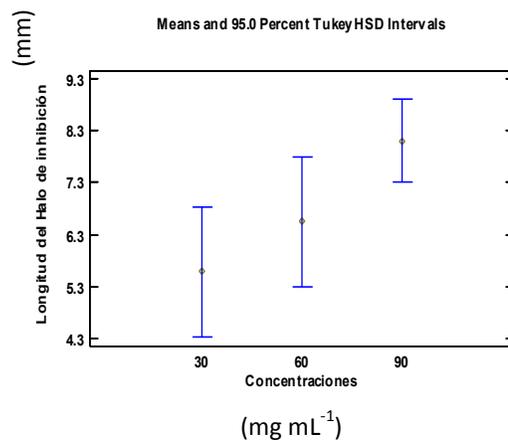


Imagen 4.- Halos de inhibición del extracto del fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Corynebacterium xerosis*.

Al no existir diferencias estadísticas significativas entre estructuras, se procedió a verificar si existían entre concentraciones. Al realizar el análisis estadístico se observó que existían diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de 30 y 90 mg mL⁻¹ y no existían entre 60 y 90 mg mL⁻¹, pero sí entre las concentraciones de 30 y 90 mg mL⁻¹; siendo esta última concentración la que presentó mayor efecto inhibitorio (gráfica 4). Cabe mencionar que la respuesta de extracto de fruto tuvo respuesta a 30 mg mL⁻¹ (CMI), su halo de inhibición fue del rango de 4.3 a 7 mm aproximadamente; pero a 90 mg mL⁻¹ el halo de inhibición fue de 7.4 a 9 mm, siendo esta concentración la que mejor efecto tuvo.



Gráfica 4.- Diámetro promedio entre las diferentes concentraciones del extracto de fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Corynebacterium xerosis*.

Para el extracto del fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Bacillus subtilis*, se presentó actividad microbiana a partir de la concentración de 60 mg mL⁻¹, siendo la concentración de 90, la que tuvo el mayor efecto inhibitorio (gráfica 5, tabla 10, imagen 5), se puede afirmar esto porque al realizar las pruebas estadísticas, existió diferencia estadística significativa en estas concentraciones.

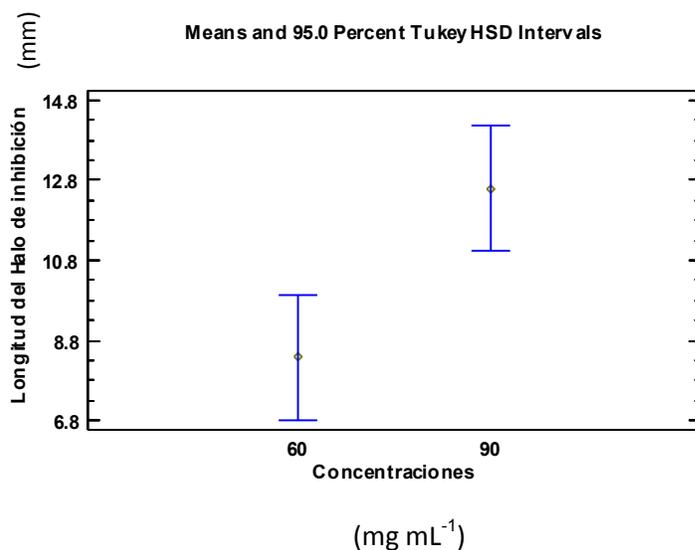


Grafico 5.- Diámetro promedio entre las diferentes concentraciones del extracto de fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Bacillus subtilis*.

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentraciones	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
60	5	8.38	0.954241	×
90	5	12.6	0.954241	×

Tabla 10.- Prueba estadística de homogeneidad entre los tratamientos vs *Bacillus subtilis*.

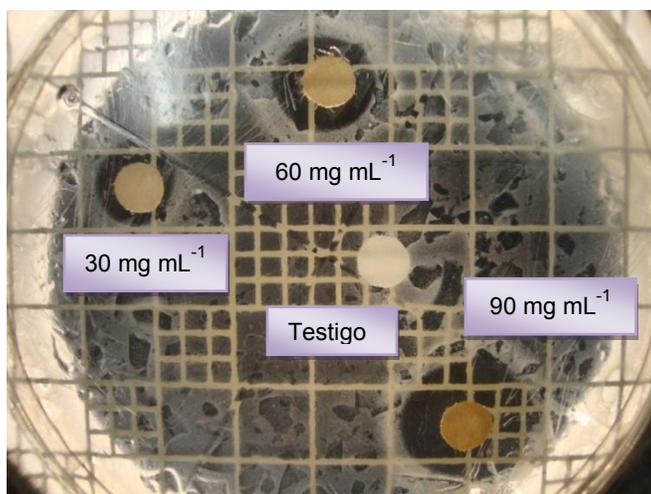


Imagen 5.- Halo de inhibición del extracto del fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Bacillus subtilis*.

Al realizar el análisis estadístico se observó que existían diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de 60 mg mL⁻¹ y 90 mg mL⁻¹ siendo esta última concentración la que presentó mayor efecto inhibitorio (11 a 13 mm aprox), mientras que para la concentración de 60, se obtuvo un halo de inhibición de 6.8 a 10.5 mm.

Al realizar las pruebas de los extractos de *Rubus liebmannii* vs *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* y *Shigella flexneri*, sólo el fruto no se tuvo respuesta inhibitoria a 30, 60 y 90 para hoja y tallo, pero si hubo para el fruto a la concentración de 120 mg mL⁻¹, por lo que no se realizó ninguna prueba estadística; pero si se registro el tamaño de los halos de inhibición del fruto vs todos los microorganismos antes mencionados.

A continuación se presentan las imágenes del extracto de fruto de *Rubus liebmannii* vs *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* y *Shigella flexneri*. En la tabla 11 se muestran los tamaños de los halos de inhibición para estos cuatro microorganismos y en las imágenes 6, 7 y 8, se muestran los halos de inhibición con los microorganismos mencionados anteriormente.

MICROORGANISMOS	Concentración a 120 mg mL ⁻¹
	Halos de inhibición
<i>Enterococcus faecalis</i>	7.3 – 8 mm
<i>Streptococcus mutans</i>	8.7 – 8.9 mm
<i>Shigella flexneri</i>	7.2 – 8.1 mm
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	6.7 – 7.5 mm

Tabla 11.- Medida de los halos de inhibición del fruto de *Rubus liebmannii* vs *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Shigella flexneri* y *Pseudomona aeruginosa*.

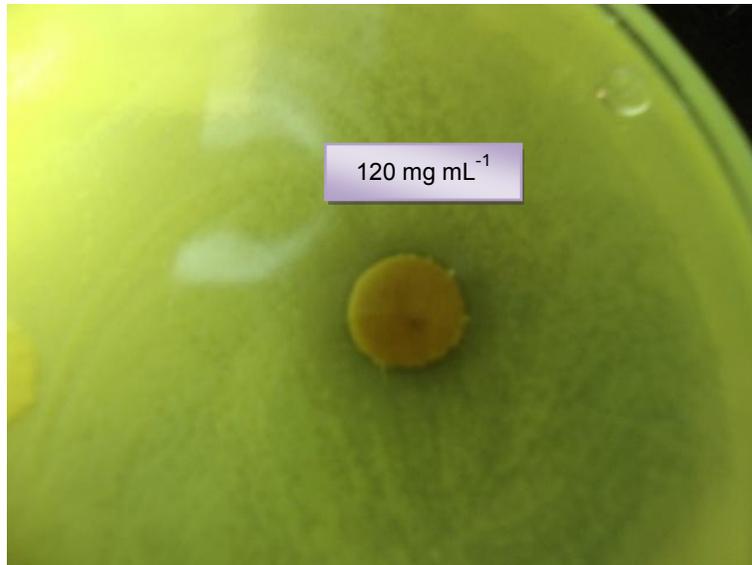


Imagen 6.- Halo de inhibición del extracto del fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Pseudomona aeruginosa*.

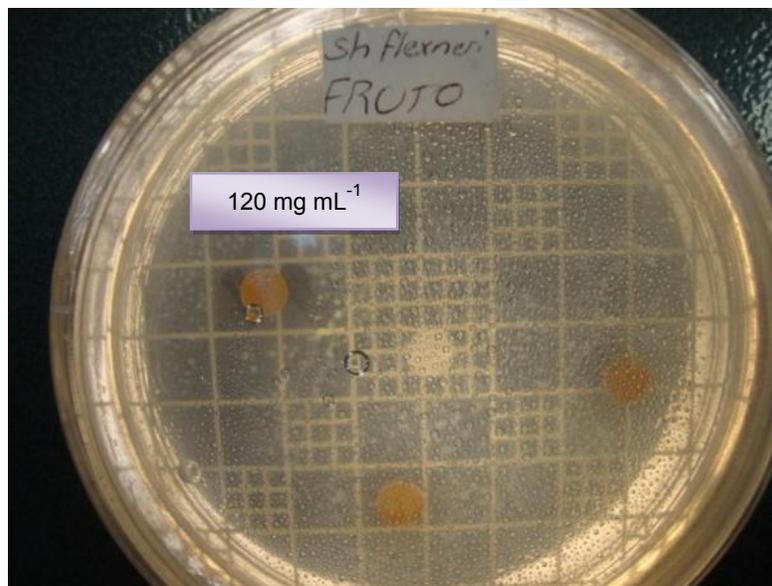


Imagen 7.- Halo de inhibición del extracto del fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Shigella flexneri*.

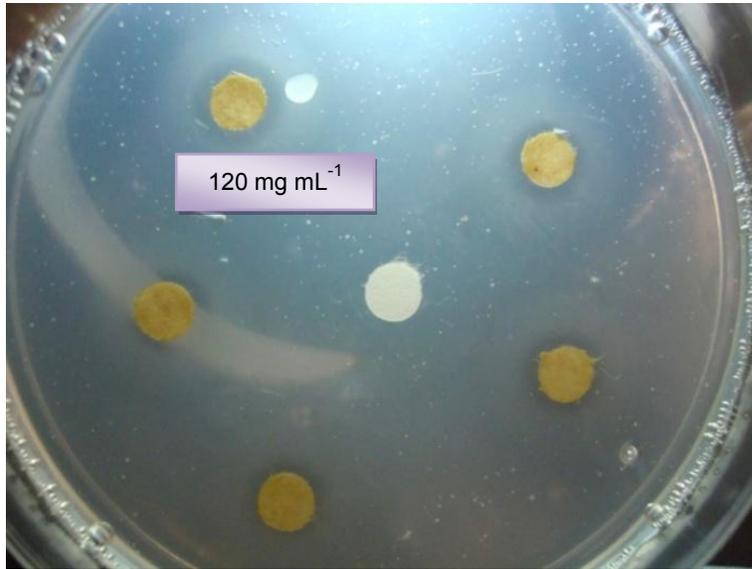
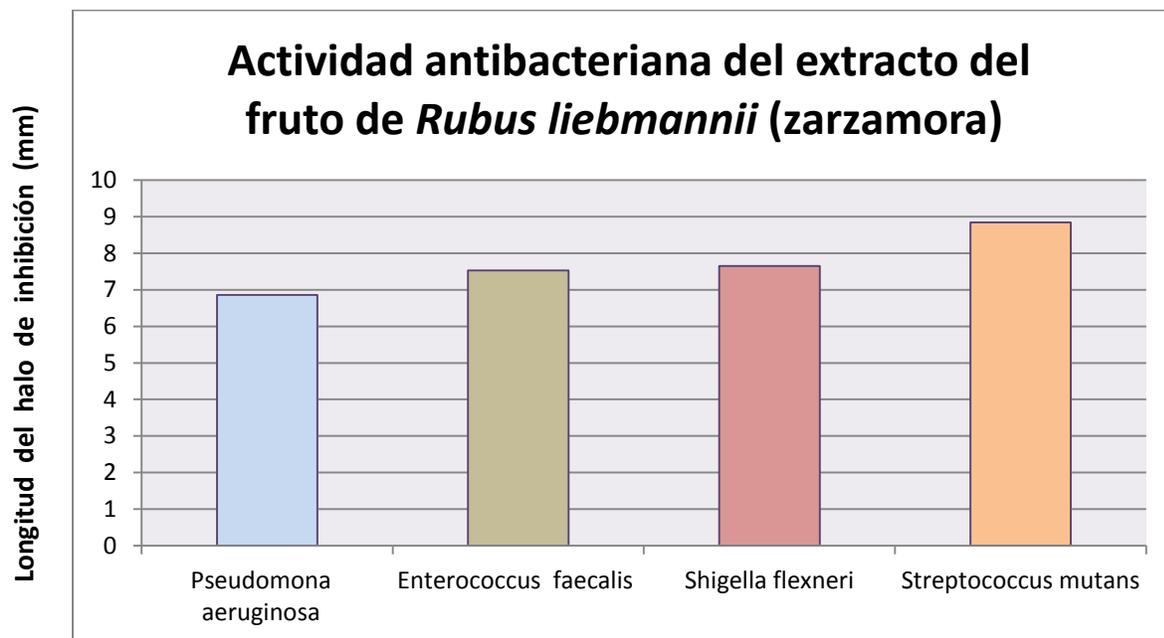


Imagen 8.- Halo de inhibición del extracto del fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Streptococcus mutans*



Gráfica 6.- Comparación de las diferencias en el diámetro de los halos de inhibición para el fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) vs *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri* y *Streptococcus mutans* a 120 mg mL⁻¹.

Prueba de toxicidad

El porcentaje de mortalidad en *Artemia salina* fue más alto para la estructura de fruto con 33.5 % a la CMI de 120 mg mL⁻¹ y menor con 6.68 % a la CMI de 90 mg mL⁻¹ con la estructura de hoja, sin embargo de acuerdo a la dosis letal media, al no alcanzar una mortalidad del 50%, no se consideran concentraciones tóxicas.

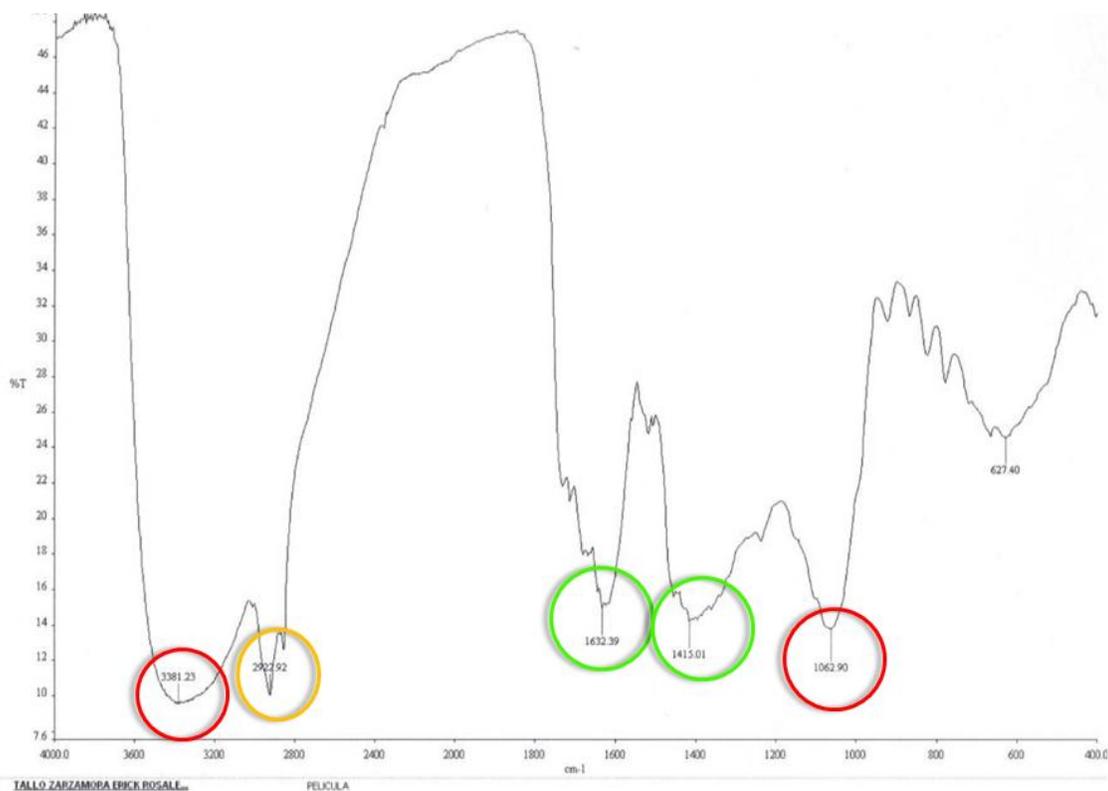
PRUEBA DE TOXICIDAD									
	FRUTO					HOJA		TALLO	
CMI	T	30 mg mL ⁻¹	60 mg mL ⁻¹	90 mg mL ⁻¹	120 mg mL ⁻¹	T	90 mg mL ⁻¹	T	30 mg mL ⁻¹
	50	50	34	30	30	50	40	50	43
	50	50	42	49	37	50	50	50	50
	50	50	-	40	35	50	50	50	41
	50	-	-	-	31	-	-	-	-
% mortalidad	0	0	24	20.68	33.5	0	6.68	0	10.68
DL ₅₀		No tóxico	No tóxico	No tóxico	No tóxico		No tóxico		No tóxico

Tabla 12.- Toxicidad de los extractos de *Rubus liebmannii* (zarzamora), en su CMI vs *Artemia salina*.

Presencia de grupos funcionales en tallo de *Rubus liebmannii* (zarzamora)

Al número de onda de 3381cm^{-1} se tiene el enlace O-H de alcoholes y que relacionado con la señal de 1062cm^{-1} indica la presencia de alcoholes primarios. A la señal de 2922cm^{-1} se tienen cadenas de alcanos y finalmente a la señal de 1632 y 1415cm^{-1} alquenos conjugados y monosustituidos respectivamente.

3381cm^{-1} -OH alcohol	2922cm^{-1} alcano	1632cm^{-1} alqueno conjugado	1415cm^{-1} alqueno monosustituido	1062cm^{-1} alcohol 1 ^o
----------------------------------	-----------------------------	--	---	---

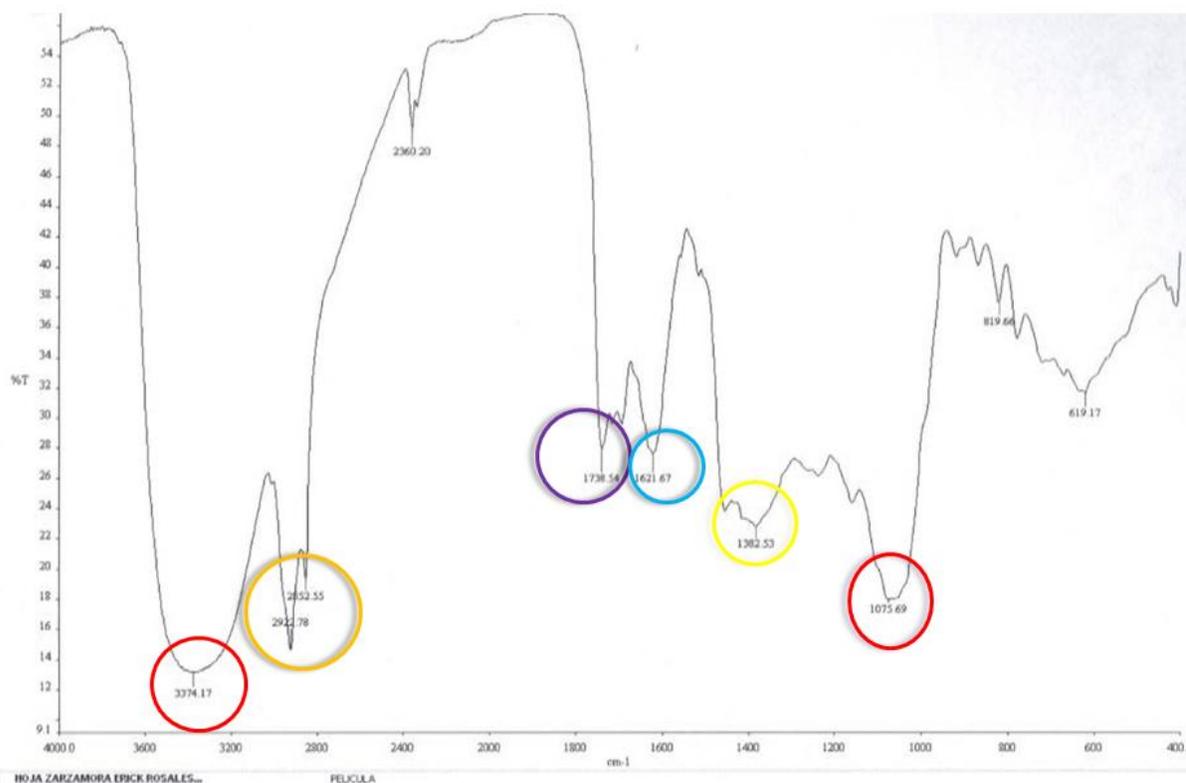


Gráfica 7.- Espectro de infrarrojo para el extracto etanólico de tallo de *Rubus liebmannii* (zarzamora).

Presencia de grupos funcionales en hoja de *Rubus liebmannii* (zarzamora)

Al número de onda de 1738 cm^{-1} se tiene la presencia del grupo carbonilo que se puede relacionar a la estructura del ácido carboxílico o a la de un éster. A la señal de 3374 cm^{-1} se tiene el enlace O-H de alcoholes y que relacionado con la señal de 1075 cm^{-1} indicaría la presencia de alcoholes de tipo primarios y secundarios. A la señal de 2922 cm^{-1} se tienen cadenas de alcanos y alquenos no conjugados a la señal de 1621 cm^{-1} . Por último a la señal de 1382 cm^{-1} la presencia del carboxilato del ácido carboxílico.

3374 cm^{-1} O-H alcohol	2922 cm^{-1} alcano	1738 cm^{-1} C=O ácido y éster	1621 cm^{-1} alqueno no conjugado	1382 cm^{-1} -COO Carboxilato del ác. carboxílico	1075 cm^{-1} C-O alcohol 1 ^{do} y 2 ^{do}
--------------------------------------	---------------------------------	--	---	--	--

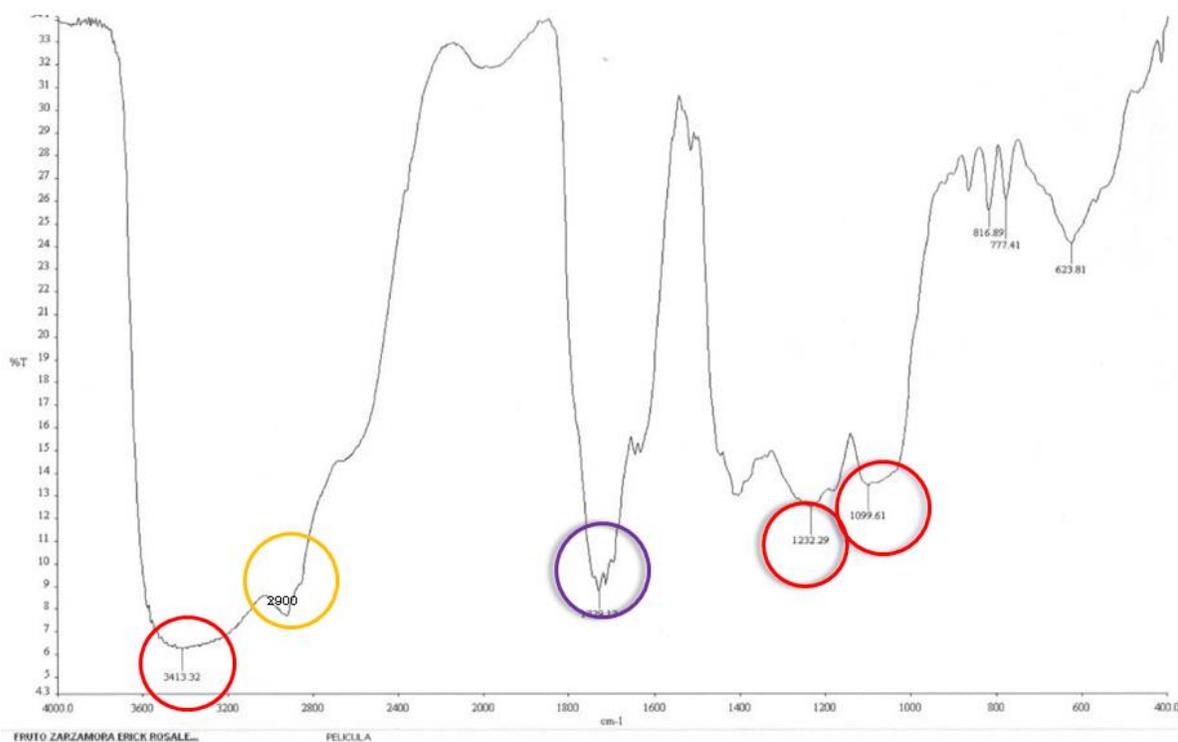


Gráfica 8.- Espectro de infrarrojo para el extracto etanólico de hoja de *Rubus liebmannii* (zarzamora).

Presencia de grupos funcionales en fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora)

Al número de onda de 1729 cm^{-1} se tiene la presencia del grupo carbonilo que se puede relacionar al ácido carboxílico. De la misma manera a la señal de 3413 cm^{-1} se tiene enlace O-H de alcoholes y que relacionado con la señal de 1232 cm^{-1} indicaría la presencia de fenoles y de alcoholes de tipo secundarios a la señal de 1099 cm^{-1} .

3413 cm^{-1} O-H alcohol	2900 cm^{-1} alcano	1729 cm^{-1} C=O ácido y ester	1232 y 1099 cm^{-1} C-O fenol, alcohol 2 ^{do}
-----------------------------------	------------------------------	---	---



Gráfica 9.- Espectro de infrarrojo para el extracto etanólico de fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora).

CONCLUSIONES

Rubus liebmannii (zarzamora) presentó actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos del hombre.

El fruto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) presentó el mayor efecto antimicrobiano, ya que inhibió el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigela flexneri*.

Seguido de hoja con *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*.

Finalmente, el tallo presentó actividad antimicrobiana en *Bacillus subtilis*.

Las bacterias gram positivas presentaron mayor sensibilidad a los extracto de *Rubus liebmannii* (zarzamora) a la concentración mínima inhibitoria de 30 mg mL⁻¹ para *Corinobacterium xerosis* y para *Streptococcus pyogenes*; a 60 mg mL⁻¹ para *Bacillus subtilis*; y finalmente a 120 mg mL⁻¹ para *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Shigella flexneri* y *Pseudomona aeruginosa*.

Las CMI de los diferentes extractos que mostraron efecto antimicrobiano, no fueron tóxicas con base en el resultado del porcentaje de mortalidad en *Artemia salina*.

Los espectros de IR-FT para el tallo muestran la presencia de alcoholes primarios. En la hoja se observaron alcoholes primarios y secundarios; finalmente, en el fruto se registró la presencia de alcoholes secundarios y fenoles, los cuales están relacionados con la actividad antimicrobiana del grupo funcional.

Con base en los resultados obtenidos se recomienda el uso terapéutico de *Rubus liebmannii*, preferentemente utilizar el fruto por su efecto antibacteriano probado en el presente trabajo.

REFERENCIAS

Aldana, J. A., 2010, "Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones y subfracciones obtenidas a partir de hojas de *Elaeagia utilis* sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*", Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá Colombia.

Ara, A., 1994, *Las 40 plantas medicinales más populares*, 3ª edición, Ed. Edaf, España, 220 págs.

Ávalos, A.; Pérez-Urria, E., 2009, "Metabolismo secundario de plantas", *Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), Universidad Complutense, Madrid, España, pp. 119-145.

Bailón, L.; Gonzales, R.; Cervantes, A., 2005, *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*, Ed. UNAM, México, pp. 9,17, 25-30.

Cabrera, L., 1986, *Plantas curativas de México*, 4ª edición, Ed. Editores Mexicanos Unidos, México, pp. 370-371.

Cai, Y., 2012, "Characterization of the antibacterial activity and the chemical components of the volatile oil of the leaves of *Rubus parvifolius* L.", *molecules*, pp. 7758-7768.

Castro, T., 2004, "Alimento vivo para organismos acuáticos", Ed. Editor, México, pp. 67-80.

Cervantes, S. A.; Marques, D. S. M.; Rivera, G. P., 2006, *Análisis estadístico: un enfoque práctico con Statgraphics*, UNAM, DF, México, 113 págs.

Cornejo, J.; Jiménez A., 2006, "Pharmacological potential from *Rubus liebmannii* micropropagated and the callus biomass", *Pharmacologyonline* 3, pp. 454-461.

De la Cruz, M.; Badiano, J., 1996, *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*: manuscrito azteca de 1552, Fondo de cultura económica, DF, México, 528 págs.

De Paula J. S.; Martins A. S., 2000, "Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*", *Rev. Cubana Plant. Med.*, Escuela de Farmacia y Odontología, Departamento de Ciencias Biológicas, pp. 26-29.

Delaat, A., 1985, *Microbiología*, 2ª Edición, Ed. Interamericana, México, pp. 37-38, 43-47.

Forbes, B., 2009, *Bailey & Scott; diagnóstico microbiológico*, 12ª edición, Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1026 págs.

Granados R.; Villaverde C., 1998, *Microbiología*, Ed. Paraninfo, Madrid España.

Hersch, M. P., 2000, *Plantas medicinales: relato de una posibilidad confiscada, El estatuto de la flora en la biomedicina mexicana*. Colección científica, Serie Antropología Social del Instituto Nacional de Antropología e Historia, DF, México, 620 págs.

Jackson, M. L., 1964, *Análisis químico de suelos*, 3ª edición, Ed. Omega, Barcelona, España, 662 págs.

Jiménez A.; Cornejo J., 2012, "Microbiological and pharmacological evaluation of micropropagated *Rubus liebmannii* medicinal plant", Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 7 págs.

Jiménez, F. J., 1994, *Plantas medicinales de San Juan Tepecoculco, Municipio de Atlautla, Estado de México*, Tesis de Licenciatura en Biología, FES Zaragoza, UNAM, DF, México, pp. 103-104.

Koneman, E. W., 1999, *Diagnóstico microbiológico, texto y atlas a color*, 5º Edición, Editorial Médica Panamericana, pp. 26, 781-785.

Kuklinski, C., 2003, *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias*, Medicamentos de origen natural, Ediciones Omega, Barcelona, España.

Lara, F.; Márquez, C., 1996, *Plantas medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica*, Ed. UNAM, 137 págs.

Levinson, W.; Ernest, J., 1992, *Microbiología e inmunología médica*, 2ª Edición, Ed. Manual Moderno. México, pp. 87, 363, 510.

Linares, E., 2005, *Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales*, Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, 155 págs.

-----; Bye, R., 2013, "Códice De la Cruz-Badiano: Medicina Prehispánica". *Arqueología Mexicana*, Edición Especial 50, pp. 8-14.

Lizcano, A. J.; Vergara, J. L., 2008, "Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes*

rhopaloides y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos”, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

Lobo, G.; Charris, J.; Taddei, A., 2012, “Síntesis y actividad antimicrobiana de derivados de 4,6 – diaminopirimidinas análogos de citosina”, *Avances en Química*, 7(2), Caracas, Venezuela, pp. 119-128.

López, P. Y., 2007, “Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22”, *Bioquímica*, Vol. 32, No. 4, pp.117-125.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J., 2006, *Brock, Biología de los microorganismos*, 10ª Edición, Pearson, Prentice Hall. Madrid, España, 1011 págs.

Martínez, M., 1979, *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas*, Fondo de Cultura Económica, México, pp. 1-5.

-----, 2005, *Las plantas medicinales de México*, 7ª Edición, Edición, Ed. Botas, Tomo I, México, pp. 1-5.

Martínez, P., 2004, “Facultad de Química de Colombia: Análisis del procedimiento para la determinación de la DL50 (Dosis Letal Media)”.

Martínez, R. M., 2006, *Evaluación in vitro del efecto inhibitorio de los principios activos de Eryngium carlinae y Lupinus montanus en microorganismos patógenos del hombre*, Tesis de Licenciatura en Biología, FES- Zaragoza, UNAM, DF, México.

Mata, R., 2000, *Curso teórico de farmacognosia: material didáctico*, Facultad de Química, Ed. UNAM, México, pp. 11-13.

NOM-21-RECNAT-2000, Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, Estudios, muestreo y análisis, Norlex Internacional, Edición Electrónica de Leyes, Publicada en el Diario Oficial de la Federación, el 7 de diciembre de 2001, SEMARNAT.

Payrol, J.; Miranda, M.; Toledo, C.; Castillo, O., 2001, “Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón), *Revista Cubana de Farmacia*, 35 (1).

Peña, A., 2001, *Qué es el metabolismo*, La ciencia para todos/184, Fondo de Cultura Económica, Secretaría de Educación Pública y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, DF, México.

Redmore, F., 1981, *Fundamentos de química*, Ed. Prentice-Hill Hispanoamericana, México, pp. 570-580.

Reyes, P., 1982, *Bioestadística aplicada*, Ed. Trillas, DF, México, pp. 110-112.

Rius, A. C. A., 2007, *Espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de masas*, Facultad de Química, UNAM, DF, México, 102 págs.

Rubio, J.; Segade, J., 1985, *Espectroscopia*, Ed. Alambra, Madrid, España.

Rzedowski, J.; Rzedowski, G., 1979, *Flora fanerogámica del Valle de México*, Ed. Continental, DF, México, 403 págs.

Sánchez, O., 1969, *La Flora del Valle de México*, Ed. Herrero, 5ª edición, pp. 191-194.

Schauenberg, P.; Paris, F., 1980, *Guía de las plantas medicinales*, 4ª edición, Ed. Omega, Barcelona, España, pp. 27-32, 68-73.

Sepúlveda, J. G., 2003, "La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas", *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 21, No. 3, pp. 355-363.

Simón, W.; Clero, T., 1970, *Tablas de elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*, Tomo I, Ed. Alhambra, México.

Villar, A., 1999, *Farmacognosia general*, Ed. Síntesis, Madrid, España, pp. 41-48, 66, 178, 225, 231,233.

Zambrano, C. J. A., 2008, *Efecto inhibitorio del extracto de Quercus obtusata Humboldt & Bonpland sobre algunos patógenos y su toxicidad*, Tesis de Licenciatura en Biología, FES- Zaragoza, UNAM, DF, México, 95 págs.

Zeidan, R.; Oran, S., 2013, "Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv. (Rosaceae)", *African Journal of Microbiology Reserch*, Vol. 7 (44), pp. 5114-5118.

Zepeda, A. G., 2012, *Efecto antimicrobiano y tóxico del extracto de Aquillea millefolium L.*, Tesis de Licenciatura en Biología, FES- Zaragoza, UNAM, DF, México, 66 págs.

GLOSARIO

Agente terapéutico: antimicrobiano que se utiliza en el tratamiento de las infecciones.

Antibiótico: antimicrobianos de origen microbiano, la mayoría de los cuales son el producto de hongos o bacterias del género *Streptomyces*.

Antimicrobiano: compuesto químico, natural o sintético, que provoca la muerte o inhibe el crecimiento de los microorganismos.

Bactericida: cuando un agente provoca la muerte celular pero no dan lugar a la lisis o rompimiento de las células.

Bacteriolítico: cuando un agente provoca la muerte celular por lisis, el rompimiento celular se detecta por un descenso abrupto en el número de células

Bacteriostático: cuando un agente inhibe el crecimiento bacteriano pero las células no mueren.

Célula diana: cualquier célula que tiene un receptor específico que reacciona con una hormona, antígeno, anticuerpo, antibiótico u otra sustancia específica.

Concentración Mínima Inhibitoria: es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe por completo el desarrollo bacteriano de forma visible dentro del medio de cultivo.

Conocimiento empírico: designa, en primer lugar, el saber adquirido en la práctica. Un segundo significado de *empírico* es su condición de conocimiento válido, es decir, del que puede ser puesto a prueba o ensayado. En una tercera connotación, *empírico* equivale a factual, esto es, un enunciado empírico es el que se refiere a estados de hecho.

Espectroscopia de infrarrojo: rama de la espectroscopia que trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético. Puede usarse para identificar un compuesto e investigar la composición de una mezcla.

Farmacognosia: ciencia que trata de la historia, de la producción, del comercio, de la recolección, de la selección, de la identificación, de la valoración, de la conservación y el empleo de las plantas y de otros productos, con valor económico, extraídos de las plantas y de los animales.

Fitoquímica: es una especialidad que deriva de la farmacognosia y se dedica al estudio químico de las plantas medicinales, trata sobre los métodos de obtención de los componentes activos, su clasificación de acuerdo al grupo funcional al que pertenece.

Grupo funcional: conjunto de estructuras submoleculares, caracterizadas por una conectividad y composición elemental específica que confiere reactividad química específica a la molécula que los contiene.

Halo de inhibición: zona alrededor de un disco impregnado de antibiótico, colocado dentro de una placa de agar inoculada, en el que no se produce crecimiento bacteriano. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al patógeno.

Metabolito primario: son aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas. La mayor parte del carbono, nitrógeno y energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos

Metabolito secundario: compuestos de bajo peso molecular que presentan una distribución restringida en el reino vegetal, tienen funciones ecológicas específicas, participando en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente.

Planta medicinal: vegetal en cuyas partes contenga alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos.

Principio activo: molécula que, producida por el metabolismo de un organismo vegetal, se encuentra dotada de una actividad farmacológica puntual (generando en el organismo modificaciones en una o más de sus células) y pueden ser por tanto empleadas en la terapéutica.

Terapéutica: como un constructo social y cultural, como una realidad que se crea y se recrea a través de cuatro procesos íntimamente vinculados entre sí: investigación, educación superior, práctica clínica y regulación de medicamentos.

Tintura: preparación líquida que se obtienen por la acción disolvente del alcohol sobre diversas sustancias.

Toxicidad: es la capacidad de cualquier sustancia química de producir efectos adversos sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.