



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Estudio de la acción antibacteriana inhibitoria de las plantas medicinales *Punica granatum*; *Schinus molle* y *Aloysia triphylla*, cultivadas en el Campus II de la FES Zaragoza

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GLORIA JACINTO JIMÉNEZ



DIRECTORA: BIÓL. MARICELA ARTEAGA MEJÍA
ASESOR DE TESIS: Q.F.B. MANUEL ORDUÑA SÁNCHEZ

México, D. F.

ABRIL DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna JACINTO JIMÉNEZ GLORIA,
con número de cuenta 078440553 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 06 del mes de Abril de 2015 a las 13:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- | | |
|------------|---------------------------------------|
| PRESIDENTE | DR. JOSÉ ÁNGEL ROJAS ZAMORANO |
| VOCAL* | BIOL. MARICELA ARTEAGA MEJÍA |
| SECRETARIO | Q.F.B. MANUEL ORDUÑA SÁNCHEZ |
| SUPLENTE | Q. MARTHA TRINIDAD J. OLIVEROS GARCÍA |
| SUPLENTE | Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO |

El título de la tesis que se presenta es: **Estudio de la acción antibacteriana
inhibitoria de las plantas medicinales *Punica granatum*, *Schinus molle* y *Aloysia triphylla*,
cultivadas en el campo II de la F.E.S Zaragoza.**

Opción de titulación: **Informe del Servicio Social-Tesis**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 18 de Febrero de 2015.

~~DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ~~
~~DIRECTOR~~
~~ZARAGOZA~~
~~DIRECCION~~

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. RAQUEL RETAMA UGALDE
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias primeramente a mi Dios por haberme permitido vivir hasta el día de hoy y poder agradecer.

A la Bióloga y Directora de tesis Maricela Arteaga Mejía por ser paciente y comprensiva conmigo.

Al Asesor QFB. Manuel Orduña Sánchez por la amabilidad y paciencia que tuvo conmigo.

Al QFB. Oscar Moreno, por confiar en mí y dedicarme parte de su tiempo.

A la IQ. Martha Oliveros por ser estricta conmigo, pues gracias a eso aprendí.

Le agradezco al Dr. José Ángel Rojas Zamorano por el interés y dedicación que tuvo para que pudiera llegar hasta donde he llegado hoy.

A la Dra. Lourdes Castillo Granada por el apoyo desinteresado en lo que se refiere al apoyo instrumental en la realización e interpretación de los espectros de IR.

A mi hermana Isela por su apoyo moral.

A mis amigas, que siempre creyeron en mí y que comparten conmigo esta felicidad, Gloria, Ana María, Irma, Gerardo, Rosalba, Paulina, Claudia, Cristina, Miriam, e Hilda.

DEDICATORIA

Dedico ésta tesis a mi esposo, Enrique que siempre tuvo fe en mí, que sin su gran apoyo, a cada paso que yo daba, nunca hubiera podido concluir lo que un día empecé.

A mi hija Celtzin que siempre me ayudo cuando la necesité.

A mi hijo Dante, por su comprensión y paciencia.

Y a ti papá que te moriste con la ilusión de verme titulada

ÍNDICE

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
MARCO TEÓRICO	15
LAS PLANTAS MEDICINALES	18
Breve historia del uso de las plantas medicinales	20
Las plantas medicinales y sus principios activos	22
Extracción de los principios activos.	24
EL ESPECTRO INFRARROJO, MÉTODO PARA IDENTIFICAR GRUPOS FUNCIONALES	28
UBICACIÓN Y CLIMA DEL LUGAR DE ESTUDIO DE LAS TRES PLANTAS MEDICINALES.	29
LAS PLANTAS DE ESTUDIO Y SUS CARACTERÍSTICAS.....	31
Granada (<i>Punica granatum</i>).	31
Compuestos de la planta con el probable efecto antimicrobiano	32
Pirul (<i>Schinus molle</i>).....	33
Compuestos de la planta con el probable efecto antimicrobiano.	33
Cedrón (<i>Aloysia triphylla</i>).	35
Compuestos de la planta con el probable efecto antimicrobiano.	35

MEDIOS DE CULTIVO.....	36
AGENTE ANTIMICROBIANO.....	38
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	39
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	40
ANTIBIOGRAMA.....	40
MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO	41
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	46
OBJETIVOS.....	47
Objetivo General.....	47
Objetivos Particulares.....	47
HIPÓTESIS.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
Material	48
Métodos	50
Fase de gabinete	51
Fase de campo	51
Reconocimiento del área.	51
Colecta de las especies.....	51
Herborización	52
Fase de laboratorio.....	52
Maceración y obtención del extracto de las plantas.....	52
Estandarización del inóculo microbiano.	53
Inoculación de las placas.....	54

Colocación de los discos	54
Lectura de los resultados	55
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	56
Tipo de estudio	56
Población de estudio.....	56
Criterios de inclusión y exclusión	56
Variables	57
Operatividad de variables	58
RESULTADOS	58
Halos de inhibición producidos por los diferentes extractos etanólicos.	59
Efecto inhibitorio de los diferentes extractos etanólicos de las plantas en estudio frente a diferentes concentraciones y especies bacterianas.	61
GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL IR	68
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	74
CONCLUSIONES.....	77
SUGERENCIAS.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÉNDICE	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Mapa de Distrito Federal y ubicación de la FES- Zaragoza	24
Figura. 2. <i>Punica granatum</i>	26
Figura. 3. <i>Schinus molle</i>	27
Figura. 4 <i>Aloysia triphylla</i>	29
Figura. 5. Discos impregnados con el extracto, el central sólo contuvo una disolución etanólica, que además sirvió de testigo para la inhibición nula	50
Figura.6. Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Streptococcus agalactiae</i> frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza de <i>Punica granatum</i> , corteza de <i>Schinus molle</i> y hoja con flor de <i>Aloysia triphylla</i>	58
Figura 7. Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Streptococcus pyogenes</i> frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza de <i>Punica granatum</i> y fruto de <i>Schinus molle</i>	58
Figura 8. Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Streptococcus mutans</i> frente a diferentes concentraciones de extractos de hoja de <i>Punica granatum</i> y fruto de <i>Schinus molle</i>	59

Figura 9. Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza <i>Punica granatum</i> , hoja de <i>Schinus molle</i> y hoja con flor de <i>Aloysia triphylla</i>).	60
Figura 10 Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Bacillus subtilis</i> frente a diferentes concentraciones de extractos del fruto de <i>Schinus molle</i> y hoja de <i>Punica granatum</i> .	61
Figura 11. Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Corynebacterium xerosis</i> frente a diferentes concentraciones de extractos corteza de <i>Punica granatum</i> y hoja de <i>Schinus molle</i> .	62
Figura 12. Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Shigella flexneri</i> frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza y hoja de <i>Punica granatum</i> .	63
Figura 13 Halos de inhibición (mm) presentados por <i>Salmonella typhi</i> frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza de <i>Punica granatum</i> y fruto de <i>Schinus molle</i> .	64
Figura 14. Comparación del efecto inhibitorio a una concentración de 250 mg/mL de la corteza de <i>Punica granatum</i> frente a diferentes microorganismos	65
Figura 15. Espectro IR de hoja de <i>Schinus molle</i> (<i>pirul</i>)	66
Figura 16. Espectro IR de Corteza de <i>Schinus molle</i> (<i>pirul</i>)	67

Figura 17. Espectro IR de Fruto de <i>Schinus molle</i> (<i>pirul</i>)	68
Figura 18. Espectro IR de Hoja de <i>Punica granatum</i> (<i>granada</i>)	69
Figura 19. Espectro IR de Corteza de <i>Punica granatum</i> (<i>granada</i>)	70
Figura 20. Espectro IR de Hoja con flor de <i>Aloysia triphylla</i> (<i>cedrón</i>)	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de las variables a elegir.	53
Cuadro 2. Pesos obtenidos y rendimiento del material que se utilizó.	54
Cuadro 3. Resultado del efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> y <i>Aloysia triphylla</i> frente a las bacterias patógenas en las diferentes concentraciones	55
Cuadro 4. Resultado del efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> frente a las bacterias patógenas en las diferentes concentraciones.	56

RESUMEN

La tradición en herbolaria que heredamos de las culturas prehispánicas, ha sido de utilidad como un recurso medicinal a la que han tenido acceso especialmente los estratos de nuestra sociedad de menores recursos económicos, y en ocasiones debido a la lejanía de los servicios de salud en muchas de nuestras comunidades rurales, es el único medio medicinal al que se tiene acceso. Sin embargo, en todas las aplicaciones curativas a las que se han destinado, no se cuenta con el sustento científico que soporte el uso de diferentes plantas medicinales, además. El objetivo de la presente tesis fue investigar si tres plantas medicinales que se cultivan en la FES Zaragoza, poseen efecto antibacteriano, además del que comúnmente se les adjudica en la medicina herbolaria: *Punica granatum* (granada); *Schinus molle* (pirul) y *Aloysia triphylla* (cedrón). Todas ellas cultivadas en el jardín botánico de la FES Zaragoza UNAM. Se investigó la acción antibacteriana de extractos etanólico de diferentes partes de estas plantas, frente a diez especies de las que se sabe causan enfermedades infecciosas en el hombre: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus mutans*. Los extractos se obtuvieron por maceración, seguida de una filtración simple. De cada planta estudiada se obtuvieron cinco concentraciones de 60, 90, 120, 200, y 250 mg/mL de cada parte elegida (hoja con flor, hojas, fruto y corteza), Se impregnaron discos con extracto etanólico de cada parte de las plantas y de las concentraciones elegidas. Se sembraron las especies bacterianas en el medio de cultivo Mueller Hinton, la acción antibacteriana se evaluó mediante las técnicas de sensibilidad a los antimicrobianos con la técnica de

Kirby-Bauer y Barry. Se analizaron los resultados de las pruebas de inhibición para conocer el tamaño del halo y de la concentración mínima.

Los resultados indican que los extractos vegetales de *Punica granatum*, *Schinus molle*, y *Aloysia triphylla* tienen acción inhibitoria sobre 8 de las 10 cepas bacterianas probadas, el extracto etanólico de hoja de *Punica granatum*, fue el que más bacterias inhibió y corteza de *Punica granatum* la que presentó halos de inhibición más grandes.

El espectro de IR del extracto etanólico de hoja de pirul nos permite asegurar la presencia de ácido carboxílico, de esteres fenólicos y alifáticos, estructura tipo alcanos, fenol y alcoholes primarios. En la corteza se observaron fenol y alcohol primario y presencia de grupos amida. En el fruto se observaron ácidos carboxílicos. En hoja de granada se observaron grupos amida secundaria, alcoholes secundarios; en corteza se observa la presencia de grupos O-H, alcoholes secundarios, grupos éter y cadena alifática. Hoja con flor de cedrón muestra la presencia de ácido carboxílico, alcoholes terciarios y cadenas alifáticas de más de cuatro metilenos.

INTRODUCCION

El estudio de las plantas medicinales en México data desde la época prehispánica en la que los aztecas organizaban por su utilidad los diferentes tipos de plantas, éste hecho maravillo a los europeos quienes sabían que, a base de tradición, éste conocimiento se transmitía de generación en generación, el conocimiento de las drogas de origen natural se fue transmitiendo primero de manera oral y posteriormente de forma escrita, registrada en papiros pergaminos, tablas de barro cocido, y más recientemente mediante sistemas computarizados de información (1).

Un gran número de plantas son analizadas sistemáticamente en relación con su posible valor farmacológico, antiinflamatorio, hipotensoras, hipoglucémicas, amebicidas, anti fertilidad, cito tóxicas, antibióticos y anti párkinson, entre otros más, como resultado de los procedimientos modernos de aislamiento y de experimentación farmacológica, las plantas medicinales nuevas encuentran su camino hacia la medicina, en estado de sustancias purificadas, más que en forma de antiguos preparados galénicos; la preparación está limitada, por lo general, a una o pocas firmas comerciales que manipulan todas las materias primas (1).

Así algunas sustancias ya sirven como modelo químico y se utiliza la síntesis orgánica evitando la deforestación, en años recientes ha renacido un inmenso interés en medicina hacia los sistemas en fitoterapia tan estrechamente relacionados con los recursos vegetales. Con la occidentalización de muchos pueblos se plantea la urgente necesidad de registrar sus conocimientos antes de que se pierdan por completo; la forma alarmante en que se avanza en el exterminio de especies vegetales en ciertas áreas, incluso antes de que dichas plantas hayan sido registradas y

mucho menos, estudiadas químicamente, vienen a incrementar la necesidad de realizar cada vez mayores esfuerzos respecto a la conservación genética de las plantas medicinales utilizadas en determinadas zonas, en la actualidad la quimiotaxonomía vegetal, los estudios genéticos referentes a metabolitos secundarios, el cultivo artificial de cultivos vegetales, los efectos de productos químicos sobre metabolitos vegetales y la inducción de síntesis deficientes en plantas, están llamando la atención de más botánicos y químicos (1).

Se estima que el número de especies de plantas con flores se cuentan entre 200,000 y 250,000, distribuidas entre unas 300 familias y 10,500 géneros pese a la rápida expansión de la literatura fitoquímica, sólo un pequeño porcentaje de la totalidad de las especies se ha estudiado y queda, por tanto, un amplio campo de investigación en el futuro; En muchas regiones del mundo las plantas utilizadas por el pueblo han sido adecuadamente registradas, pero en otras regiones, por ejemplo en Sudamérica, con su vasta flora de plantas potencialmente útiles, el arte de la medicina popular entre grupos aborígenes está en rápido declive debido al cambio de modo de vida del pueblo, cambio de usos de suelo, entre otros, los etnobotánicos están actualmente librando una batalla contra el tiempo para recoger esas informaciones antes de que se pierdan con una generación y, con ello, un posible atajo para llegar a algunas plantas medicinales útiles. Las gimnospermas, producen diversas esencias y resinas útiles así como el alcaloide efedrina; y las angiospermas, que a su vez se dividen en monocotiledonias y dicotiledóneas, estos dos últimos grupos, nos surten de fármacos muy útiles, especialmente las dicotiledóneas, sus principios activos sirven como modelos químicos. La naturaleza y cantidad de metabolitos secundarios presentes en las plantas se

ven afectados por la temperatura, lluvia, orientación, duración del día (incluyendo la calidad de la luz) y altitud. Estos efectos han sido estudiados mediante el cultivo de determinadas plantas en diversas áreas climáticas y la observación de sus variaciones (1).

MARCO TEÓRICO

Gracias al desarrollo de métodos de extracción y purificación, se ha logrado obtener de los vegetales, una gran diversidad de sustancias que han tenido relevancia en el quehacer humano, como la quinina del árbol de la quina y la cocaína a partir de la coca (2).

A medida que se dispuso de derivados artificiales de los productos naturales, la importancia de las fuentes botánicas pasaron a un segundo plano, La priorización de las drogas sintéticas sobre las naturales se volvió absoluta (2).

La ciencia ha permitido grandes descubrimientos en la medicina, los avances en el diagnóstico y la terapéutica son sorprendentes, han aumentado nuestra calidad y duración de vida, nuestra capacidad para tratar las dolencias graves no tiene precedentes en la historia de la humanidad. El diseño y descubrimiento de fármacos más potentes que permiten actuar sobre diferentes dolencias, ha llevado también al uso excesivo o erróneo de esos productos, ha provocado la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos y de numerosas complicaciones graves, como resultado del efecto iatrogénico de su inadecuada aplicación (2).

En el afán por sintetizar fármacos nuevos y más potentes la comunidad médica ha olvidado el papel importante que han jugado las plantas medicinales. De los ciento cincuenta productos farmacéuticos más populares vendidos en la actualidad, más de ochenta contienen ingredientes activos derivados de fuentes naturales. Sólo se han explorado cerca del 2% de las más de doscientas cincuenta mil especies de plantas

superiores a fin de determinar si poseen propiedades farmacológicas y terapéuticas (2).

Ante el desencanto del público por la farmacognosia moderna, el interés por las plantas con fines curativos, ha ido creciendo, han aumentado las ventas del producto a base de plantas medicinales, así como una mayor difusión tanto de los productos naturales para la salud, como de las terapias alternativas, no solo entre el público que los consume, sino entre los profesionales de la salud. En la actualidad siguen desarrollándose de forma industrial nuevos productos medicinales con extractos, básicamente de una sola planta, estandarizados para un principio activo específico (3).

Sin embargo, faltan rigurosas investigaciones clínicas, que apoyen o descarten los supuestos efectos medicinales de muchas plantas. No hace muchos años, parecía inevitable que los avances en medicina y las innovaciones de la industria farmacéutica harían disminuir de forma drástica el uso de remedios medicinales tradicionales. Resulta paradójico que, en una época en la que disponemos de una muy grande cantidad de fármacos para tratar todo tipo de enfermedades, siga existiendo una demanda de remedios medicinales tradicionales, y que estén aumentando de forma constante desde la pasada década. La desilusión generalizada con la medicina moderna, aunado al deseo por llevar un estilo de vida más natural, ha provocado un aumento en el uso de la medicina complementaria y alternativa (MCA) en todos los países desarrollados. La aplicación de la MCA ha aumentado independientemente del género, etnia y nivel de educación pero es más frecuente entre la gente joven. La utilización de la fitoterapia aumentó especialmente en la década de 1970 y posteriormente en la década de 1990 (3).

Diferentes culturas de todo el mundo han utilizado las plantas con fines terapéuticos durante miles de años. Según la organización mundial de la salud, el 80% de la población mundial utiliza remedios a base de plantas como fuente principal de salud, en algunos países, las plantas medicinales siguen siendo una parte importante del sistema médico, especialmente en estratos sociales de menores recursos económicos o para aquellos cuyo acercamiento a los servicios de salud ortodoxos, es geográficamente inaccesible (3).

México es el país que tiene el segundo inventario más grande del mundo con 4500 plantas medicinales registradas a Familia, Género y especie, así como los usos terapéuticos atribuidos por las culturas, el primer lugar lo ocupa China con 5000 Plantas medicinales, en tercer lugar está Colombia con 2600 plantas medicinales; en el mundo se comercializan unos 10,000 medicamentos alópatas diferentes, la mayoría de ellos tuvieron su origen en la herbolaria, es sorprendente que no se haya usado ni siquiera el 1% de la herbolaria mundial para obtenerlos, pues el interés científico se orientó a los medicamentos sintéticos. La herbolaria es tan bondadosa que bien se podría desarrollar al menos otros 10,000 medicamentos, pero ahora, medicamentos herbolarios químicamente complejos y con mucho menos efectos secundarios. México tiene un inmenso potencial para desarrollar al menos 4500 nuevos medicamentos herbolarios con la posibilidad de desarrollar también grandes industrias agrícolas que requerirán varios miles de hectáreas para cultivar las materias primas, con el requerimiento también de miles de campesinos, los cuales se sentirían estimulados para quedarse a trabajar la tierra, pues tendrían mayores posibilidades de ingresos económicos al asociarse a éstas agroindustrias (4).

Durante miles de años, en distintas culturas y países, las plantas se han venido usando ininterrumpidamente como remedios naturales para acabar con diversas enfermedades. Seguras y efectivas, han superado con éxito la prueba del tiempo y han ayudado a millones de personas a mantener o recobrar su salud. Hoy son usadas por un número cada vez mayor de personas que buscan reemplazar los medicamentos sintéticos usualmente arriesgados, por remedios íntegramente naturales. Puede parecer extraño que las drogas modernas puedan ser sustituidas por infusiones de la abuela, polvos, soluciones o tinturas. No obstante, considerable evidencia científica respalda el uso de las medicinas herbales. Además muchas de las actuales medicinas que se ofrecen en el mercado son versiones sintéticas de sustancias encontradas en las plantas. Dichas plantas poseen diversas propiedades que las hacen superiores a las drogas sintéticas en muchos aspectos, como la de estar en sintonía con el organismo y, por ende, generar pocos y, definitivamente, menos efectos secundarios. Más aún la mayor parte de las hierbas poseen múltiples y variados usos, proporcionando siempre mayores beneficios que efectos adversos. Así mismo, las hierbas cumplen funciones que las drogas no pueden llevar a cabo. Finalmente, las hierbas poseen la ventaja adicional de que pueden ser obtenidos sin prescripción, además de ser relativamente baratas y bastante seguros si son usados correctamente (5).

LAS PLANTAS MEDICINALES

El hombre depende de los vegetales, tanto directamente para alimentarnos como indirectamente para nutrir a los animales que luego comeremos (6).

Además las plantas medicinales han sido una parte fundamental en la farmacopea de todas las culturas del mundo. La OMS en 1992 promovió una serie de recomendaciones para la regularización de los productos terapéuticos preparados con plantas medicinales. Así mismo, se estima que la población mundial será de 7.500 millones de personas en el año 2020, de las cuales el 75% vivirá en países en desarrollo y consumirá sólo el 15% de los medicamentos de síntesis química total del mercado, por lo que dependerán enormemente de los fitofármacos. En occidente, desde hace unas décadas se ha apreciado un interés que va en aumento por el uso de las plantas medicinales, y que constituyen, en ciertas circunstancias, una ayuda dentro de los cuidados primarios de la salud y un complemento terapéutico, perfectamente compatible con la medicina clásica. Por otro lado, también se hace necesario que los productos fitoterapéuticos tengan una serie de garantías de calidad científica: a) conocimiento de sus efectos secundarios, b) interacciones c) contraindicación, etcétera, así como existencia de los análisis farmacológicos y de experimentación clínica que demuestren eficacia para el tipo de dolencias que pretenden tratar. La OMS y las autoridades sanitarias de la Unión Europea han emitido directrices en ésta dirección, incluso, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), con sede en Londres, creó en 1997 un grupo de trabajo sobre medicina basado en plantas, también el grupo de control de Productos Vegetales Medicinales (HMPWG), que han creado una serie de normas de control para fitoterapia y que han de ser seguidos por todos los Países de la Unión Europea, un hecho importante que debe ser motivo de reflexión es que las plantas nos ofrecen en muchos casos moléculas únicas y muy difíciles de sintetizar.

La medicina moderna le debe mucho a la fitoterapia, ya que se ha proveído de muchos conocimientos ancestrales provenientes de ésta para formarse, por ejemplo *Catharanthus roseus*, vegetal de los trópicos del que se ha obtenido la vincristina y la vinplastina, ambos antineoplásicos de amplio uso, y *Phodophyllum peltatum* que es la fuente del podofilino antiberrucoso y antitumoral (7).

Breve historia del uso de las plantas medicinales

Con la llegada de los españoles a América muchas de las experiencias farmacológicas desarrolladas a través del tiempo se conjugaron con los adelantos indígenas, el denominado “boticario” indígena, después de hacer acopio de materias primas para sus preparaciones, recolectados en campos y montañas, desiertos y bosques, ríos y mares, las vendían sobre esteras, formando su pacalli o panamacoyan (botica) en los tianquiztli (mercados), también existía un conjunto de cirujanos especializados en la curación de enfermedades de localización anatómica precisa. Los boticarios precortesianos requerían estar mejor informados acerca de las noticias de las plantas, de su geografía, de sus caracteres definitivos y en suma, de la botánica, además de lo anterior aprendían la también identificada “farmacia” o habilidad en la preparación y conservación de los medicamentos simples de los que estaban encargados y que los médicos pedían para hacer sus compuestos, ya que en el mundo prehispánico las profesiones eran heredadas, los hijos del farmacéutico o herbolario tenían que serlo también y los conocimientos y nociones pasaban de padres a hijos, las sustancias empleadas en la farmacia indígena eran minerales, animales, y principalmente vegetales (8).

En América, diversas culturas que aun asombran a todos los investigadores del mundo, se destacaron por su amplio y profundo conocimiento de las plantas medicinales. Para los aztecas y los mayas, la diosa Tzapotlantenam presidía la medicina en general, y el dios Xipe era el causante de varias enfermedades. Los aztecas conocían muy bien y empleaban diversas plantas medicinales. Entre ellas, de las más empleadas, se pueden mencionar: al “agave”, “ciprés de Moctezuma”, “jalapa”, “liquidámbar”, “papaya”, y “ulli” (9).

Podemos señalar al mexica, como el único pueblo del mundo que registró y analizó cuanto vegetal existió en su territorio. No hubo planta comestible en el Valle de Anáhuac sin nombre y ninguna planta medicinal o tóxica que hubiera pasado inadvertida, todas las plantas a las que recurrían, fueron clasificadas e investigadas. Averiguaron tanto sus propiedades nutritivas como las medicinales, además de los cuidados requeridos para su crecimiento. Tuvieron un jardín botánico, incluso antes que en Europa hubiera éste tipo de jardines, en Tenochtitlán ya existían para estudiar, cultivar, y hacer experimentos de aclimatación con la gran variedad de árboles, flores y plantas existentes en el imperio mexica. Transmitían de generación en generación sus enseñanzas por medio de pinturas y glifos. Gracias a algunos documentos y códices conservados y a la labor de investigación de Fray Bernardino de Sahagún y por el Protomédico Francisco Hernández fue posible salvar parte del vasto saber mexica sobre la medicina y las plantas medicinales. La transmisión de las experiencias sobre farmacia (plantas medicinales), se realizó por la conversión al cristianismo de los indígenas, tal es el caso del indígena Martín de la Cruz, autor del primer libro de herbolaria titulado: *Libellus de Medicinalibus*

Inderum Herbis, que fue traducido por Juan Badiano y es el llamado Códice Badiano (10).

Las plantas medicinales y sus principios activos

Las plantas medicinales han sido muy utilizadas por nuestros ancestros y se continúan usando con la misma confianza y frecuencia en muchas comunidades rurales de cualquier país (11). Las plantas son unos laboratorios bioquímicos extraordinarios, a partir de sustancias tan simples como el agua (H_2O), de la tierra y el dióxido de carbono (CO_2) del aire, son capaces de producir glucosa, devolviendo además oxígeno (O_2), al aire, la formidable reacción química, que es la fotosíntesis sólo es posible gracias a la clorofila contenida en las hojas de las plantas, que captan la energía lumínica del sol y la transforman en energía química, las moléculas de glucosa se polimerizan para formar almidón o celulosa en las hojas de las plantas y al combinarse con las sales minerales y otros elementos del suelo que se absorben en la raíz darán lugar a la síntesis de lípidos, esencias, glucósidos, taninos, vitaminas, proteínas, alcaloides, taninos, y otros principios activos (12).

Entre las sustancias activas mencionadas que se han obtenido están:

ALCALOIDES. Desde un punto de vista farmacológico se trata de las sustancias más activas presentes en la naturaleza, en sentido positivo o negativo, porque algunos representan los venenos más potentes conocidos, ejemplo la nepalina, aconitina, estricnina, colchicina; Químicamente los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas.

Algunos son líquidos, y en éste caso no contienen oxígeno, la mayoría de las veces son sólidos cristalizables y

contienen oxígeno. En la naturaleza, en general, están presentes en estado de sal (13).

ACEITES ESENCIALES: Son mezclas complejas, normalmente líquidas, que presentan una característica: su volatilidad, por tanto son extraíbles en corriente de vapor de agua, en general son los responsables del olor de las plantas. Se definen, como productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien destilación seca, el aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros modos de obtención, puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos en su composición por ejemplo re destilación, aireación, etcétera (14).

TANINOS: Estos compuestos frenan la diarrea porque tienen acción astringente que reduce la inflamación intestinal, esto lo realizan ligándose a la capa de proteínas de la superficie de las membranas mucosas inflamadas cuyo espesor aumenta, impidiéndose así la reabsorción de materiales tóxicos y disminuyendo por ello las secreciones. Tales taninos son más eficaces que los que se van liberando de los diversos complejos que forma parte de la planta cuando ésta alcanza el tracto gastrointestinal inferior (15).

FLAVONOIDES: Reducen la fragilidad capilar y aumentan el umbral de hemorragia capilar, también actúan eliminando los radicales libres e inhibiendo la per oxidación de los lípidos de las membranas de las células, previniendo la oxidación de las proteínas celulares, que se inactivarán por la formación de enlaces cruzados, y evitando las lesiones del ADN que podría llevar a la muerte de las células o a su transformación maligna (15).

MUCÍLAGOS: Son una masa amorfa de color blanquecino que forma coloides con el agua, siendo ésta propiedad físico-química la principal responsable de su acción farmacológica, ya que actúan como protectores plásticos de los tejidos; además de su capacidad para retener agua, tiene un efecto laxante mecánico y producen sensación de plenitud en regímenes de adelgazamiento, son frecuentes en diversas familias botánicas como las *Malváceas* (16).

SAPONINAS: Sustancias que, con el agua, forma espuma, por lo que se ha empleado como jabón y tiene propiedades hemolíticas (17)

Extracción de los principios activos.

Periódicamente aparecen noticias sobre nuevos compuestos aislados de fuentes naturales que pueden utilizarse en el tratamiento de diversas enfermedades. La técnica más habitual para aislar éstos compuestos de sus fuentes naturales es la extracción: la extracción es un método empleado para separar unos compuestos químicos de otros con los que se encuentran mezclados y disueltos en un mismo disolvente (18). Hay varias posibilidades para obtener los principios activos, a partir de la planta o de precursores de origen natural que serían: Métodos extractivos a partir de la planta, semisintéticos y biotecnológicos. Pero los utilizados con mayor frecuencia son el método extractivo a partir de la planta, a continuación se describen algunos de ellos (19).

Extracción mecánica: Es una técnica que permite obtener los extractos disueltos en los fluidos propios de la planta (conocido como jugo).

La extracción mecánica se puede realizar: Por expresión, compresión o bien por cortes o incisiones a la planta (19).

Destilación: La destilación es una de las técnicas más utilizadas para separar líquidos de impurezas no volátiles, o bien separar mezclas de líquidos miscibles, los líquidos a separar deben presentar puntos de ebullición inferiores a 150°C a presión atmosférica, al calentar la mezcla los componentes se evaporan para condensar, posteriormente, de éste modo el vapor se enriquece con el componente más volátil, la separación de los componentes de una mezcla por destilación es tanto más fácil cuanto mayor sea la diferencia entre sus puntos de ebullición (20).

Extracción con disolventes: Algunos textos denominan a la extracción solido-líquido “lixiviación” y dejan el término de “extracción” a la operación líquido-líquido, la extracción líquido-líquido es la operación de separación de uno o varios componentes de una mezcla líquida mediante un disolvente inmiscible con ella y de distinta naturaleza (21).

Los tipos de extracción, se pueden englobar en dos grupos: **a) las extracciones discontinuas y b) las extracciones continuas**

a) Extracción discontinua o simultánea: La extracción es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente. En la práctica es muy utilizada para separar compuestos orgánicos de las soluciones o suspensiones acuosas en las que se encuentran (22).

Para efectuar este procedimiento, se puede auxiliar de algunos procesos que lo complementen entre ellos:

a. Maceración: Es una técnica adoptada para extraer a largo plazo todas las sustancias activas. Se vierte agua o alcohol (o vinagre en algunos casos) a temperatura ambiente sobre la sustancia vegetal desmenuzada y machacada y se deja en reposo durante unas horas o durante uno o varios días (hasta un mes) según las especies empleadas, durante todo éste tiempo es necesario agitar de forma periódica la mezcla, por último se filtra con cuidado comprimiendo los vegetales macerados (23).

b. Digestión: Es un método similar a la maceración pero en el que se trabaja a temperatura más elevada (19).

c. Infusión: Preparado en forma líquida para extraer los principios activos de ciertas plantas, por medio de agua caliente o alcohol (24).

d. Decocción o cocimiento: Para preparar tisanas deben usarse las partes duras de las plantas (troncos gruesos, raíces, cortezas, semillas), en un recipiente adecuado se pone la cantidad de agua apropiada y a la misma se agregan las partes de las plantas, todo junto se pone en frío al fuego y se deja hasta que haya hervido durante unos minutos a fuego lento, transcurrido éste tiempo se aparta del fuego, se deja tapado para que repose unos diez minutos y finalmente se pasa el cocimiento por un colador, es preferible hervir las partes de la planta solo

un minuto, tiempo suficiente en general para que los principios activos de la planta pasen al agua (25).

b) Extracción continua o progresiva: El disolvente se suministra al medio y constantemente se va renovando, debe elegirse el disolvente que sea afín al soluto que se extraerá, mantener en todo momento el desequilibrio entre la concentración formada por la mezcla del principio activo y el contenido intracelular del tejido vegetal, y de esta manera se produzca la difusión celular hacia el disolvente. Se utilizan varios métodos de extracción continua entre los cuales se encuentran (18).

a. Percolación. También conocida como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará, se requiere agregar solvente constantemente (26).

b. Soxhlet. Se basa en la capacidad de un disolvente, o mezcla de éstos, de extraer selectivamente uno o varios solutos que forman parte de una muestra sólida. Para ello se utiliza un extractor sólido-líquido tipo Soxhlet, que consta de una cámara de extracción, un matraz donde se encuentra el disolvente y un sistema de condensación de vapores (27).

EL ESPECTRO INFRARROJO, MÉTODO PARA IDENTIFICAR GRUPOS FUNCIONALES

Los compuestos orgánicos absorben energía electromagnética en la región infrarroja (IR) del espectro, ocasionando que los átomos y los grupos de átomos de los compuestos orgánicos vibren más rápido en torno a los enlaces covalentes que los conectan. Éstas vibraciones están cuantizadas, y cuando se presentan, los compuestos absorben energía IR en regiones específicas del espectro (28).

Los espectrómetros IR funcionan con un haz de radiación IR se hace pasar a través de una muestra y se compara constantemente con un rayo de referencia, a medida que se hace variar la frecuencia de la radiación incidente. El espectrómetro traza los resultados como una gráfica que presenta la absorción en relación con la frecuencia o la longitud de onda. La localización de una banda de absorción IR (o pico) se puede especificar en unidades de frecuencia por su número de onda (ν) que se mide en centímetros recíprocos (cm^{-1}) o por su longitud de onda (λ) medida en micrómetros (μm) (28).

La espectroscopia IR proporciona un método invaluable para reconocer en forma rápida y simple la presencia de ciertos grupos funcionales en una molécula (28).

Los grupos hidroxilos de los alcoholes y fenoles son fáciles de reconocer en los espectros IR, por su absorción de alargamiento O-H. El pico agudo en la región de $3590\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a grupos hidroxilos “libres” (sin asociar). El aumento en la concentración del alcohol o el fenol hace que el pico agudo sea sustituido por una banda amplia en la región de $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$.

Esta absorción se atribuye a grupos OH asociados por enlaces intermoleculares (28).

UBICACIÓN Y CLIMA DEL LUGAR DE ESTUDIO DE LAS TRES PLANTAS MEDICINALES.

Las plantas elegidas, fueron cultivadas y recolectadas en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II. El plantel se localiza en el área del Peñón del Marqués, dentro de la delegación Iztapalapa y en cuyas faldas del lado sur, se encuentra el Campus II, a 2 400 msnm, al oriente de la ciudad de México, a una Latitud N 19° 21' y Longitud O 99° 0' 1'', colinda al este con el municipio Netzahualcóyotl, Estado de México su relación geográfica con respecto a las delegaciones políticas del Distrito Federal es: al sur Tlahuac y Xochimilco, al oeste con Benito Juárez y Coyoacán, y al norte con Iztacalco, como se ve en la figura 1 (29).



Figura 1.- Mapa de Distrito Federal y ubicación de la FES-Zaragoza (29).

CLIMA

El clima de Iztapalapa está comprendido en el grupo de climas templados, esto es con temperatura media del mes más frío entre -3° y 18°C , el clima C (w) con el siguiente significado: C (w) templado, subhúmedo con lluvias en verano, con % de lluvia invernal entre 5 y 10.2 del anual, precipitación del mes más seco 40mm. Siendo el más seco de los templados sub húmedos, y con lluvia en verano con un cociente P/T 43.2 (29).

LAS PLANTAS DE ESTUDIO Y SUS CARACTERÍSTICAS

Las plantas seleccionadas para este trabajo, sus características taxonómicas, botánicas, farmacológicas, así como el uso medicinal para las que comúnmente se utilizan son:

Granada (*Punica granatum*).



Fig. 2 *Punica granatum* (Granada)

Se trata de un arbusto o árbol pequeño, perteneciente a la familia de las Punicaceas, figura 2. Se caracteriza por presentar una altura máxima promedio, entre los 2,5 a 6 m. El tronco es corto, ramificado casi desde la base. Sus ramas son espinosas. Su corteza es delgada de un color pardo-grisáceo. Tiene hojas opuestas, cortamente pecioladas, oblonga-lanceoladas, y brillantes, entre 3 a 7 cm de largo. Sus flores son rojizas, grandes, con pétalos suborbiculares, de 1,5 a 2,5 cm de largo, dispuestas de manera solitaria o agrupadas de 2 ó 3 frutos (las granadas) que tienen un diámetro entre 5 a 10 cm, su pulpa es blanca o rosada con numerosos granos ácidos, cada uno con una semilla en su interior. La corteza del fruto es de consistencia dura y se encuentra coronado por el prominente tubo endurecido del cáliz (30).

Compuestos de la planta con el probable efecto antimicrobiano

Corteza: alcaloides piperidinicos (pelieterina, metilpelieterina) y taninos (22%).

Hojas: 2-(2-propenil)- δ -piperideina, taninos, granatinas A y B, corilagina, estricnina (trazas), púnica folina y punicolaginas (taninos elagicos) (30).

Usos etnomedicinales.

Su uso más popularizado es el de vermífugo (especialmente teniasis), empleando para ello la decocción de la corteza del tronco o de la raíz, así como también el jugo del fruto. Como antidearréico y antidisentérico emplean la decocción de la cáscara del fruto (sola o hervida con leche). Esta última forma de preparación también se recomienda, en menor medida, como antiparasitario, en bronquitis, metrorragias y blenorragias. El jugo del fruto tiene indicación de uso en infecciones urinarias, ictericia, diabetes e hipertensión arterial; también se utiliza en forma tópica para aplicarse en duchas vaginales, en gargarismos (faringitis), se ha utilizado también en el tratamiento contra las hemorroides, como enema en caso de diarrea; contra las hemorragias, blenorragias y leucorrea. La decocción de la hoja se aplica tópicamente para tratar exantemas. Además, las granadas son ingeridas al natural como antitusivas, en tanto que su jugo tiene indicación de uso como hemostático en heridas de piel (30).

Pirul (*Schinus molle*)



Fig. 3 *Schinus molle* (Pirul)

Es un árbol resinoso, fragante, de follaje persistente, como se observa en la figura 3. Pertenece a la familia de las Anacardiáceas. Alcanza una altura promedio de 10 m en su máximo desarrollo. Su tronco es grueso, con una corteza asurcada y hojas alternas, compuestas, glabras, las flores son pequeñas, de color amarillo verdoso, el fruto es una pequeña drupa rojiza, de unos 5 mm de diámetro, de sabor picante (30).

Compuestos de la planta con el probable efecto antimicrobiano.

Hojas: Flavonoides (quercetina, rutina, quercitina e isoquercitina), pigmentos antocianidicos, triterpenos- β -sitosterol y aceite esencial. Además contiene a los ácidos linolenico, lignocérico y esteárico, presente también en corteza y semillas (30).

Frutos: Se han aislado aceites esenciales que contienen: α -bergamontranseno, bourboneno, α y γ -colacoreno,

calameneno, canfeno, carvacrol, β -cariofileno, γ -copaeno, croweacina, cianidina-3-galactocido, cianidina 3-rutinosido y peonidina-3-glucosido (30).

Usos etnomedicinales.

En el Río de la Plata, le confieren a la infusión de sus hojas (al 1%) el ser regulador del ciclo menstrual, en tanto que la corteza y las hojas se emplean en forma de infusión en casos de piorrea, blenorragia (también el aceite esencial) y como antiinflamatorio general. Las hojas en fricción sobre el cuerpo se emplean como repelentes de insectos. La corteza seca y molida se emplea en uso tópico, como antiinflamatorio y antiséptico. La resina como purgante, antirreumática, anti bronquítico y desinfectante tópico (30).

En Perú utilizan las hojas tiernas en infusión para combatir cólicos abdominales. A su vez las hojas y tallos jóvenes se emplean en decocción para lavar heridas y grietas cutáneas, la oleoresina como cicatrizante, en caso de dolor de muelas y como purgante. En México emplean el sumo de las hojas en casos de oftalmopatías, reumatismo y blenorragia, mientras que el cocimiento de sus hojas como diurético y en forma de baño para el prolapso uterino. El fruto como carminativo y anti blenorragico (30).

Cedrón (*Aloysia triphylla*).



Fig. 4 *Aloysia triphylla* (Cedrón)

Arbusto aromático, pertenece a la familia de las verbenáceas. Se caracteriza por lograr una altura promedio entre 1.5 a 2.5 m. Tiene ramificaciones estriadas con tallos angulosos, hojas de 5 a 7.5 cm de largo por 0.5 a 2 cm de ancho, verticulada, lanceoladas y con gránulos oleíferos en el envés, ásperas al tacto y agrupadas de a tres en los tallos. Presenta pequeñas flores blanquecinas, de 6 mm de largo, dispuestas en espigas axilares o panículas terminales, durante el verano y otoño. El fruto es un esquizocarpo con cáliz persistente, figura 4 (30).

Compuestos de la planta con el probable efecto antimicrobiano.

Aceite esencial (0.1-0.5%) compuesto por un 39% de aldehídos (citral, neral (12%) geranial (26%), fotocitral, citronelal, epifocitral). Tiene un 18% de sesquiterpenos, α -farneseno, α y β -cariofileno, germacraneno, arcurcumeno, ácido isovalerianico, ácido pirrónico. Tiene además entre 15 a 16% de monoterpenos, α -terpineol, geraniol, un 6% de ésteres terpénicos, acetato de geranilo, acetato de nerilo, limoneno (6%), (30).

Usos etnomedicinales.

La infusión de hojas y flores de cedrón se emplean popularmente como tisana antiespasmódica, anti flatulenta, eupéptica, contra palpitaciones, nauseas, mareos y vértigos. En Cuba lo emplean, además en casos de insomnio y como expectorante. En Guatemala le añaden usos antiparasitarios y antiasmáticos. En Paraguay emplean la infusión de las hojas contra las palpitaciones cardiacas. La tintura de hierba luisa (cedrón) se utiliza en Sudamérica principalmente como febrífugo y antimalarico, las hojas molidas y aplicadas en forma de cataplasma se indican en caso de odontalgias, hemorroides y várices (30).

MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo se denominan habitualmente como no selectivos, selectivos, diferenciales o selectivos-diferenciales, los medios no selectivos son nutritivamente muy ricos y se emplean comúnmente para enumerar la microbiota total o transferir y mantener los microorganismos en cultivos puros, un medio selectivo permite el crecimiento de ciertos microorganismos de interés (microorganismos seleccionados), e impide la multiplicación de microorganismos competidores. Los agentes selectivos (por ejemplo el cristal violeta que inhibe el crecimiento de las bacterias Gram (+) son componentes esenciales de éstos medios. Los medios diferenciales se utilizan ocasionalmente para distinguir entre subpoblaciones presentes en un alimento basándose en una única propiedad bioquímica. Un medio que contenga tanto agentes selectivos como diferenciales es un método eficaz para la selección y diferenciación de los microorganismos que se buscan de entre

los presentes en una microbiota compleja, los medios de cultivo pueden ser líquidos (caldos) o sólidos (agar) dependiendo del propósito del experimento (31). Medio de cultivo es cualquier sustancia o preparados que sirva para el cultivo de células vivas, medio en el que se utiliza agar como agente solidificante, el agar Mueller-Hinton, es un medio de agar que contiene infusión de buey, hidrolizado de caseína, almidón, hemoglobina y un suplemento enriquecido complejo, se emplea para pruebas de sensibilidad antimicrobiana (32).

El estudio de la sensibilidad in vitro de las bacterias a los antimicrobianos se realiza por diferentes métodos, a) fenotípicos, b) bioquímicos, c) genéticos. Los métodos fenotípicos (antibiograma) son los más utilizados, se fundamentan en el enfrentamiento de un inóculo bacteriano estandarizado a una única concentración o a un rango de concentraciones de un antibiótico determinado. Para su realización se requieren medios de cultivo (generalmente Mueller-Hinton) y condiciones de incubación definidas (temperatura-tiempo), la interpretación de los resultados obtenidos permite clasificar los microorganismos en sensibles o resistentes, que guíen la elección del antibacteriano ante un proceso infeccioso, la aplicación de éste método requiere el aislamiento previo del microorganismo mediante un cultivo microbiológico, la técnica de difusión con disco emplea discos de papel impregnados con una solución estandarizada del antibiótico que se dispone sobre la superficie de un medio sólido previamente inoculado en su superficie con una suspensión bacteriana, el disco libera en contacto con el medio sólido, el antibiótico, que difunde sobre éste, generando un gradiente de concentración a su alrededor, en la zona más cercana al disco, la concentración es elevada y menor en la más alejada, cuando ésta

es superior al valor de la concentración mínima inhibitoria se observa un halo de inhibición alrededor del disco, el diámetro del halo formado durante la incubación de 18 horas está en relación con el grado de sensibilidad o resistencia del microorganismo a la acción del antibiótico, la carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición permitan diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes y pueda establecerse una correlación con los valores de concentración mínima inhibitoria (33).

AGENTE ANTIMICROBIANO.

La actividad antimicrobiana se mide in vitro para establecer.

- a. La potencia de un antimicrobiano en solución.
- b. Su concentración en los líquidos corporales y tejidos.
- c. La sensibilidad de determinado microorganismo a una concentración conocida del fármaco (34).

Comúnmente se hace uso de los siguientes términos en relación con los agentes antimicrobianos y su uso.

Actividad bacteriostática: Valor de la actividad antimicrobiana que inhibe el crecimiento de un microorganismo. Se determina in vitro enfrentando una concentración estándar de microorganismo con una serie de diluciones de antimicrobiano. La concentración más baja que inhibe el crecimiento del microorganismo se denomina concentración mínima inhibitoria (CMI), (35).

Actividad bactericida: Sustancia química o procedimiento físico que tiene la capacidad de matar o destruir bacterias (36).

Estéril: Consiste en la destrucción total (esterilización) de los gérmenes por aplicación de calor, éste calor que se aplica puede ser seco o húmedo (37).

Desinfección: La palabra desinfección se aplica a la remoción o destrucción de microorganismos que pueden causar infección (38).

Antiséptico: Sustancia que inhibe el crecimiento de microorganismos sin destruirlos necesariamente (39).

Sensible: Término aplicado a los microorganismos que indican que se les inhibirá con concentraciones de sustancia antimicrobiana que se pueden lograr en términos clínicos utilizando las dosis generalmente recomendadas (40).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Un aspecto único de las pruebas de laboratorio en microbiología es que es posible examinar la susceptibilidad del aislado de un paciente contra una batería de sustancias antimicrobianas potenciales a fin de determinar la CMI, los métodos empleados se estandarizan, incluyendo la medida del inóculo bacteriano y las condiciones de cultivo (ejemplo, medio, incubación, tiempo), (40).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.

La concentración mínima inhibitoria (CMI), es la sensibilidad bacteriana a una serie de diluciones del antibiótico, determinando la mínima concentración de éste, la cual inhibe el crecimiento bacteriano (41).

ANTIBIOGRAMA.

Valoración de la actividad in vitro (antibiograma).

Para establecer el tratamiento de la mayoría de las enfermedades infecciosas resulta de gran ayuda conocer los agentes responsables de las mismas y la actividad que los antimicrobianos ejercen sobre ellos. El laboratorio de microbiología dispone de métodos que permiten evaluar la actividad in vitro de los antibióticos ejemplo 1) Difusión en agar (disco-placa), 2) E-test, 3) Dilución en agar, 4) Dilución en caldo, 5) Actividad bactericida del suero (ABS), 6) Curva de letalidad, 7) Efecto post-antibiótico (EPA), 8) Estudio de la asociación de antibióticos, 9) Otros estudios (42).

Los patrones de susceptibilidad a los antibióticos o antibiogramas, pueden usarse para distinguir entre cepas diferentes. Para determinar el antibiograma, se inocula un cultivo en forma uniforme en la superficie de un agar nutricional, se colocan discos de papel en la superficie del agar, los cuales se impregnan con un antibiótico dado, durante la incubación, los organismos se multiplicarán para formar una película visible de células, o se formará una área clara, indicando falta de crecimiento, alrededor de cada disco con antibiótico que inhiba al microorganismo, cepas diferentes tendrán distintos patrones de áreas claras (43).

Durante la subsiguiente incubación, el antibiótico difunde desde cada disco, si el organismo es sensible a un antibiótico determinado alrededor del disco que contiene dicho antibiótico se desarrolla una zona de inhibición del crecimiento, el diámetro de la zona carente de crecimiento puede interpretarse correctamente sólo cuando el procedimiento completo ha sido estandarizado en término de: Tipo de medio, densidad del inóculo en la placa, etc. (44).

MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.

A continuación se hace mención de los microorganismos bacterianos que se utilizarán para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las plantas, *Punica granatum*, *Schinus molle*, y *Aloysia triphylla*.

Staphylococcus aureus

Familia: *Micrococaceae*

Género: *Staphylococcus*

Especie: *aureus*

Son cocos Gram positivos, por lo regular se agrupan en pares, en cadenas cortas o en tétradas, principalmente en racimos, algunos presentan cápsula la cual es de polisacáridos, tienen un tamaño de 1 μ de diámetro No forman esporas, metabolismo anaerobio facultativo y catalasa positivo, habita en el tracto respiratorio superior no presenta movilidad es causante de una amplia, variedad de infecciones que a menudo son piogénicas. Son

causa de forúnculos, impétigo, neumonía, osteomielitis, meningitis, endocarditis, mastitis, bacteriemia, abscesos, intoxicación alimentaria, enterocolitis, infecciones urogenitales, síndrome del choque séptico, necrosis epidérmica de origen tóxico (45).

Streptococcus pyogenes

Familia: *Streptococcaceae*

Género: *Streptococcus*

Especie: *pyogenes*

Cocos Gram positivos, agrupados en cadenas o pares, miden de 0.6-1.0 μ de diámetro, la mayoría son anaerobios facultativos y algunos anaerobios estrictos, no móviles, se encuentran en la microbiota del tracto gastrointestinal, respiratorio y genital, piel y mucosas, enfermedades que producen: Faringitis, fiebre escarlatina, piodermas, erisipela, celulitis, fascitis necrotizante, síndrome de choque tóxico estreptocócico (SCTE), Bacteriemia, Enfermedades no supurativas, Fiebre reumática, Glomerulonefritis aguda (GNA) (45).

Streptococcus agalactiae

Familia: *Streptococcaceae*

Género: *Streptococcus*

Especie: *agalactiae*

Son cocos Gram positivos, se agrupan en forma de cadenas largas no esporógenos, inmóviles miden de 0.5-1.0 μ m. Su crecimiento óptimo ocurre a los 37°C, sus colonias son

pequeñas, translúcidas, o ligeramente opacas, circulares, convexas y también mucoides originadas por cepas virulentas, pertenecen al grupo B de Lancefield y la mayoría son:

B-hemolíticos, las enfermedades que ocasionan a los humanos son: Primera causa de sépsis neonatal, neumonía, meningitis en el recién nacido, en adultos produce celulitis, artritis, endometritis, bacteriemias, infecciones en heridas y septicemia (45).

Streptococcus mutans

Familia: *Streptococcaceae*

Género: *Streptococcus*

Especie: *mutans*

Son cocos Gram positivos, se agrupan formando largas cadenas, su diámetro es de 0.5-1.0µm. Son inmóviles, no esporógenos, su crecimiento óptimo se produce a los 37°C. Sus colonias son pequeñas, translúcidas, o ligeramente opacas; circulares, generalmente menores de 1mm de diámetro, convexas, si son mucoides son originadas por cepas virulentas. Son las causantes de caries dental (45).

Bacillus subtilis

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *subtilis*

Son Gram positivos, forman esporas altamente resistentes (endosporas) sus dimensiones son: 0.4-3.0µm de ancho y 2.0-9.0

µm de longitud. La temperatura óptima para su desarrollo, es de 37°C. Sus colonias van desde finamente granuladas a húmedas, de membranosas con o sin pliegues o arrugas, butirosas o de difusión uniforme, grande, opaca, mate, aplanada y pigmentada. Es causa de envenenamiento por alimentos, infecta al ojo humano muy ocasionalmente (45).

Corynebacterium xerosis

Familia: *Corynebacteriaceae*

Género: *Corynebacterium*

Especie: *xerosis*

Son bacilos Gram positivos pleomorficos, agregados en cadenas cortas, coloración irregular, formas de letras chinas, tamaño 0.3 a 0.8µ de ancho por 1 a 8µ de largo, son inmóviles, habitan en plantas y animales, colonizan piel, aparato respiratorio superior, aparato digestivo y aparato genitourinario humano, aerobios y anaerobios facultativos. Se aíslan del saco conjuntival del hombre, de manera que raramente causan infecciones, causan infecciones entre ellas: bacteriemia, endocarditis, mediastinitis, neumonía y osteomielitis vertebral (45).

Shigella flexneri

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Shigella*

Especie: *flexneri*

Son bacilos cortos Gram negativas, no móviles, no capsuladas, miden 0.7μ de ancho por 3.0μ de largo, anaerobios facultativos, habitan en el colon del humano, enfermedades que producen: Shigelosis, la Shigelosis o disentería bacilar corresponde a una severa colitis aguda cuyos principales síntomas son: fiebre, tenesmo, calambres abdominales y diarrea mucosanguinolenta, ruidos intestinales frecuentes (45).

Salmonella typhi

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Salmonella*

Especie: *typhi*

Son bacilos Gram negativos, presentan cápsula de polisacáridos, miden $1.0-3.0\mu\text{m}$ de longitud, son anaerobio facultativo, habitan en la carne cruda, productos de aves y bebidas contaminadas, es móvil, produce gastroenteritis, fiebre tifoidea, bacteriemia, y septicemia sin síntomas gastrointestinales (45).

Escherichia coli

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *coli*

Son bacilos Gram negativos, casi siempre móvil, posee estructura antigénica, son aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, se destruyen a temperatura de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a temperatura de congelación, forma parte de la micro flora normal del intestino del hombre y de animales de sangre caliente

encontrándose en sus eses, la mayor parte de las cepas son inocuas, pero existen algunas que son patógenas para el hombre, algunas *E coli* son la causa de diarrea en niños y adultos, de la diarrea de los turistas, colitis, púrpura trombótica trombocitopénica, síndrome hemolítico urémico púrpura (46).

Klebsiella pneumoniae

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Klebsiella*

Especie: *pneumoniae*

Bastoncillos medianos (1x4µm), Gram negativo, se presentan solos o en pares, móviles, encapsulados, mesofílicos, se encuentran en los contenidos intestinales y vías respiratorias de seres humanos, animales y pájaros, en el suelo, el agua y los granos, se incluye en el grupo coliforme como indicador de higiene (47).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de las plantas medicinales como fuente primordial de salud cada vez es más común, sin embargo, se desconoce qué principios activos intervienen en la recuperación de la salud y que estructura o estructuras de la planta son las adecuadas para usarlas con fines terapéuticos, tal es el caso de la acción antibacteriana de los extractos de *Punica granatum*, *Schinus molle*, y *Aloysia triphylla*, frente a bacterias patógenas del hombre.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si los extractos vegetales a diferentes concentraciones de *Punica granatum*, *Schinus Molle*, y *Aloysia triphylla*, tienen efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, así como los grupos funcionales presentes en éstos extractos vegetales.

Objetivos Particulares

1. Obtener el extracto en peso seco de las plantas medicinales de *Punica granatum*, *Schinus molle* y *Aloysia triphylla*.
2. Determinar el tamaño de los halos de inhibición y la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Punica granatum*, *Schinus molle*, y *Aloysia triphylla* cultivadas en la FES. Zaragoza, aplicando 60, 90, 120, 200 y 250 mg mL⁻¹, frente a *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*.
3. Analizar los resultados del tamaño de los halos de inhibición y de las concentración mínima inhibitoria de *Punica granatum*, *Schinus molle*, y *Aloysia triphylla*.

HIPÓTESIS

Los extractos vegetales de *Punica granatum*, *Schinus molle* *Aloysia triphylla*, contienen diferentes grupos funcionales, que coadyuvan en el efecto inhibitorio en la proliferación de *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Material biológico

Extracto vegetal etanólico de las Plantas (*Punica granatum* L, *Schinus molle* L y *Aloysia triphylla* L)

Bacterias: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium xerosis* *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*.

Material de campo

Bolsas grandes de papel de estraza, tijeras para jardinería, machete, etiquetas, charolas.

Material de laboratorio

Aparatos

Balanza granataria (marca OHAUS), rota-vapor (modelo RE300 YAMATO), recirculador (LITTLE GIANT modelo 1), reóstato (marca CRAFT), canastilla de calentamiento, autoclave (BULLETIN 836 PRESSURE-CONTROL A-B), balanza analítica (METTLER TOLEDO), cuenta colonias (SOLBAT-APARATOS-CIENTIFICOS), estereoscopio (CAR-ZEIZZ).

Equipo básico

Mechero de alcohol, gradilla metálica, asa bacteriológica, pinzas de disección, algodón, gasa, papel de estraza, cinta testigo, vernier, cerillos, plastipack, espátula, papel glaseen.

Material de vidrio

Cajas petri de 90mm, frascos ámbar de boca ancha varios tamaños, pipetas graduadas de 5mL, pipetas Pasteur, tubos de ensayo 13x100, cajas petri de plástico de 10 mm de diámetro, vaso de precipitado 100 mL, matraz erlenmeyer de 500 mL, embudo de vidrio vástago corto con estrías.

Reactivos

Disoluciones de BaCl_2 (0.048M), H_2SO_4 (0.36 N). Solución salina (NaCl 0.9 % p/p), Alcohol etílico (96° Gay Lussac).

Medio de cultivo

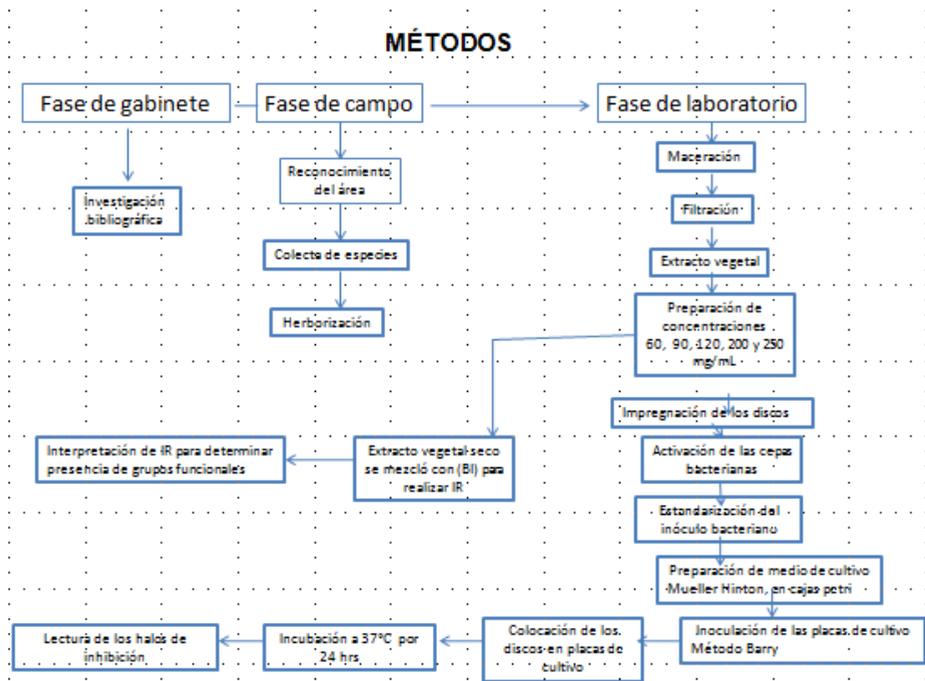
Agar Muller Hinton

Disoluciones asépticas

Fenol (5% p/p), Etanol (70% p/p) y NaClO (10% p/p)

Métodos

El proyecto se dividió en tres fases: Gabinete, campo y laboratorio.



Fase de gabinete

Se realizó una investigación bibliográfica de los fundamentos teóricos, en diversas fuentes tanto impresas como digitales de la información fundamental para este trabajo.

Fase de campo

Constó de tres etapas:

Reconocimiento del área, colecta de las especies y herborización.

Reconocimiento del área.

Se estableció cuál era la ubicación de las plantas que se estudiaron (*Punica granatum*, *Schinus molle*, y *Aloysia triphylla*). Se identificaron cuántas especies existían de cada una en el campus, a fin de establecer cuál debería de ser la cantidad mínima, procurando en todos los casos que los individuos no se afectaran en lo mínimo posible.

Colecta de las especies

Se colectaron de los especímenes, hojas, corteza, fruto y flor con hoja, se colocaron en bolsas de papel, debidamente etiquetadas, en las que se señaló la información relacionada con el vegetal, y condiciones de recolecta.

Punica granatum L (granada).

Se colectaron, las hojas y la corteza de esta planta, debido a la naturaleza de arbusto solo fue posible obtener poca cantidad de corteza, sin embargo, siempre se logró recolectar la cantidad necesaria, mientras que de hojas se obtuvo una cantidad suficiente, ambas estructuras se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% y se enjuagaron varias veces hasta eliminar residuos de hipoclorito de sodio, después se secaron durante 15 días a la sombra.

Schinus molle L (pirul).

Aquí se colectaron, las hojas, los frutos y la corteza, a fin de recolectar su corteza, y debido a la dureza y grosor, se requirió del uso de un machete. Una vez obtenida, se cortó en trozos pequeños, se colectaron sin ninguna dificultad las hojas y el fruto de pirul, se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% y se enjuagaron varias veces con agua hasta eliminar el hipoclorito presente, se dejaron secar por separado cada estructura a la sombra y por 15 días.

Aloysia triphylla L (cedrón).

Se colectaron la flor y la hoja juntas, en cantidades suficientes, se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% y se enjuagaron varias veces para quitar la presencia del hipoclorito utilizado, después se dejaron secar a la sombra aproximadamente 15 días.

Herborización

Se dejaron secar en las bolsas de papel una muestra de los materiales colectados y trasladaron al Herbario de la FES Zaragoza, a fin de que se realice la determinación taxonómica correspondiente.

Fase de laboratorio

Maceración y obtención del extracto de las plantas.

Una vez terminado el periodo de secado de las partes de cada planta se registró su peso, para finalmente efectuar el proceso de extracción, utilizando el método de maceración, por el cual se pudo obtener la tintura madre.

Para ello el material se colocó en frascos de color ámbar, con 400 mL aproximadamente de alcohol 96° GL, o hasta cubrir totalmente el material. Se selló y se dejó reposar por 15 días

en la obscuridad. A esta preparación se le sometió a agitación cada tercer día. Concluido el periodo mencionado, se filtró la tintura obtenida, y se colocó en frascos color ámbar, debidamente etiquetados, enseguida se concentró la tintura de la planta, utilizando un rotavapor. El extracto obtenido se colocó en cajas petri estériles de las que se conoce su peso, se dejaron secar las muestras y finalmente se pesaron para poder calcular el rendimiento del extracto en cada caso. Después de este proceso, se iniciaron las disoluciones con etanol que fueron de 60, 90, 120, 200 y 250 mg mL de extracto por cada parte de planta con las cuales se impregnaron los discos (48).

Enseguida se tomaron muestras de cada parte de los extractos vegetales, para realizar el estudio de IR y determinar que grupos funcionales están presentes.

Estandarización del inóculo microbiano.

La estandarización del inóculo microbiano se llevó a cabo con la escala de Mc Farland. Para lo cual se vertió 1.0 mL de solución salina a un tubo de ensayo, después se le agregó de una a tres asadas de la cepa bacteriológica en estudio, hasta que adquiriera la turbidez esperada que correspondiera al tubo 1, que en la escala de Mc Farland, se relaciona con 3×10^8 UFC. La turbidez del tubo con el microorganismo, fue la misma que la del tubo uno¹ de la escala de Mc Farland, (49).

¹ Estandarización de turbidez del inóculo: Se prepara añadiendo 0.5 mL de $BaCl_2$ 0.048M (1.175% p/v $BaCl_2$ en H_2O) a 99.5 mL de H_2SO_4 0.36 N (1% v/v); esto equivale a la mitad de la densidad del estándar Núm. 1 de $BaSO_4$ de acuerdo a la escala de Mac Farland. La suspensión estándar debe colocarse en un tubo sellado, a fin de evitar pérdidas de líquido por evaporación. Antes de ser utilizado, la suspensión estándar debe agitarse (50).

Inoculación de las placas.

Método de Barry de la “cobertura de agar”

Esta es otra técnica alternativa para inocular la superficie de las placas de Mueller-Hinton. La suspensión bacteriana se agrega al agar uniformemente sobre la superficie del medio mientras éste se halla aún líquido haciendo movimientos en forma de ochos para una mejor dispersión de las bacterias.

Este método tiene la ventaja de proporcionar una distribución más uniforme de los microorganismos y la apariencia es además más nítida, característica que permite la fácil interpretación de la zona de inhibición (51).

Se dejaron solidificar para después colocar los discos impregnados con los extractos obtenidos.

Colocación de los discos

Utilizando pinzas de punta fina pasadas por la llama del alcohol, que por supuesto debe enfriarse antes de utilizarse, se colocaron los discos elegidos sobre la placa inoculada, presionando firmemente sobre el agar, con pinzas o aguja esterilizada, a fin de que se produzca un contacto total con la superficie. Se distribuyeron los discos de manera uniforme, de modo tal que no queden a menos de 15 mm del borde de la caja petri, ni tengan una proximidad entre sí de menos de 24 mm entre el centro de uno y de otro. Una vez colocado el disco no debe moverse, debido a que la difusión de fármaco comienza casi instantáneamente. Se invirtieron las placas y se colocaron en la incubadora a 37°C, por 24 horas dentro de los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos.

Lectura de los resultados

Antes de leer los resultados de cada disco con los agentes antimicrobianos se examina la placa para confirmar que se ha obtenido una superficie confluyente de buen desarrollo, usando un fondo oscuro y luz reflejada, la placa se coloca de manera que pueda usarse una regla o calibre para medir los diámetros de los halos de inhibición para cada agente antimicrobiano, los halos se miden en el punto en que el desarrollo está ligeramente inhibido, una vez registrados los diámetros de los halos, se les asignan categorías de interpretación, sensible, resistente (52).

Después de la incubación se registró el diámetro (en mm), medido en la zona donde se produjo una inhibición del crecimiento, las dimensiones de la zona de inhibición están en función del ritmo de difusión del producto activo en el medio de cultivo, y fueron medidas usando un vernier. Las cepas que fueron utilizadas en las pruebas de inhibición antimicrobiana fueron: *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri*, y *Salmonella typhi*, que se obtuvieron del banco de cepas de la FES Zaragoza. Figura 5.



Figura 5. Discos impregnados con el extracto, el central sólo contuvo una disolución etanólica, que además sirvió de testigo para la inhibición nula.

En todos los casos, se utilizó un control que consistió en un disco que sólo estaba impregnado con etanol a 96% v/v. En ningún caso, este disco causó inhibición del crecimiento bacteriano; por tal razón se comparó siempre con el disco que contuvo la menor concentración del extracto (60 mg/mL).

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio

El estudio a realizar es de tipo longitudinal, prolectivo y descriptivo.

Población de estudio

El objeto de estudio está representado por las estructuras de: *Punica granatum*, (corteza y hojas) *Schinus molle*, (corteza, hoja y fruto) y *Aloysia triphylla*, (hoja con flor).

Criterios de inclusión y exclusión

Exclusión: Las partes de las plantas de *Punica granatum*, *Schinus molle*, y *Aloysia triphylla*, marchitas, infectadas, muy resacas, oxidadas, cambio de tonalidades en sus hojas, corteza y frutos muy viejos, hojas perforadas, hojas carcomidas por los insectos u otros animales.

Inclusión: Aquellas que fueron recientemente colectadas y que tuvieran buena presentación tal como color, integridad de las partes, floración, suficiente follaje, que tuvieran la altura máxima común y que son las plantas medicinales

Punica granatum (hoja y corteza), *Schinus molle* (fruto, hoja y corteza), y *Aloysia triphylla* (hoja con flor), cultivadas en los jardines de FES Zaragoza.

Variables

Las variables propuestas en el estudio fueron (como se especifican en el cuadro 1):

Variables dependientes

Diámetro del halo de inhibición, formado por diferentes concentraciones del extracto.

Variables independientes

- 1.- Estructura de cada una de las tres plantas seleccionadas para su estudio.
- 2.-Concentraciones probables (60, 90, 120, 200 y 250 mg/mL).
- 3.-Cepas bacterianas utilizadas.

Operatividad de variables (53)

VARIABLE [□]	DEFINICIÓN [□]	CATEGORÍA [□]	OPERATIVIDAD [□]
Efecto Antibacteriano (halo de inhibición) [□]	Formación de una zona clara alrededor del disco [□]	Cuantitativa continua. [□]	Medir el diámetro de halos (en mm), para cada concentración y para cada una de las bacterias escogidas y con cada extracto de las estructuras de cada planta seleccionada. [□]
Inóculo bacteriano [□]	Conjunto de bacterias de una misma especie [□]	Cuantitativa discreta. [□]	Se estandarizó el inóculo bacteriano, de manera que tuviera el mismo número aproximado de individuos, por inóculo escogido de las diez cepas estudiadas. [□]
Estructura de la planta (corteza, hoja, fruto y flor) [□]	Partes del vegetal que se escogieron para obtener los extractos [□]	Cuantitativa discreta. [□]	Elegir la estructura del vegetal, a fin de conocer cuál produce la mayor inhibición del crecimiento bacteriano. [□]
Concentración del extracto [□]	Las propuestas fueron: 60, 90, 120, 200 y 250 mg mL ⁻¹ [□]	Cuantitativa discreta [□]	Para cada estructura elegida de la planta, para conocer cuál de las concentraciones es más efectiva en su efecto inhibitorio. [□]

Cuadro 1. Características de las variables a elegir.

RESULTADOS

El análisis de los resultados obtenidos se realiza a partir de los extractos de las plantas frente a los microorganismos probados, así como con el análisis del rendimiento de extractos (cuadro 2), en éste, se presenta el rendimiento de los extractos en peso seco de las plantas en estudio y nos brinda información relacionada con la cantidad que se puede utilizar de planta en un posterior experimento y sobre todo, permite conocer la dosificación mínima que tiene efecto antimicrobiano (que en este caso fue de 60 mg/mL), y que fue la concentración que se utilizó como referencia para comparar el efecto de las concentraciones restantes. En todos los casos se utilizó un disco impregnado con alcohol, que en ningún caso produjo inhibición, como testigo para verificar que fue el extracto y no el disolvente el que produjo el efecto antibacteriano. Como se puede observar en el

cuadro 2, la hoja de *Punica granatum* presentó el mejor rendimiento (8.64%), seguido de corteza de *Punica granatum* con un rendimiento del (2.87%); con respecto a *Schinus molle*, se presentó el mayor rendimiento en la hoja con el 6.69%, seguido de fruto con el 3.77% y al final la corteza con 1.47%. En *Aloysia triphylla* solamente se trabajó en hoja con flor, se obtuvo un rendimiento de 4.18%, como puede observarse la hoja de *Punica granatum* es la estructura en la cual se obtiene un mejor rendimiento.

PLANTA	PESO-DE-PLANTA-SECA(g)	PESO-DEL-EXTRACTO-SECO(g)	RENDIMIENTO-(%)
<i>Punica granatum</i> (corteza)	348	9.9710	2.87
<i>Punica granatum</i> (hoja)	137	11.8368	8.64
<i>Schinus molle</i> (corteza)	899	13.1632	1.47
<i>Schinus molle</i> (hoja)	146	9.7634	6.69
<i>Schinus molle</i> (fruto)	642	24.2254	3.77
<i>Aloysia triphylla</i> (hoja y flor)	383	16.0175	4.182

Cuadro 2. Pesos obtenidos y rendimiento del material que se utilizó.

Halos de inhibición producidos por los diferentes extractos etanólicos.

A continuación, se presenta el resumen de resultados, relacionados con el diámetro de los halos de inhibición, además se muestra el efecto antibacteriano de los diferentes extractos etanólicos, frente a las diferentes especies bacterianas utilizadas.

Sólo se incluyeron los resultados para aquellas especies en las que hubo inhibición, de manera que, si no aparecen las diez especies ensayadas, implica que en las restantes, no hubo efecto inhibitorio.

		ESTRUCTURA Y CONCENTRACION																																		
		Hoja de <i>Schinus molle</i>						Corteza de <i>Schinus molle</i>						Fruto de <i>Schinus molle</i>						Hoja de <i>Aloysia triphylla</i>																
		60	90	120	200	250		60	90	120	200	250		60	90	120	200	250		60	90	120	200	250												
Conc. (mg/mL)																																				
<i>Staphylococcus aureus</i>		+					-						-						-						+						+					
<i>Streptococcus s. agalactiae</i>		+					+						+						+						+						+					
<i>Streptococcus s. pyogenes</i>		+					+						+						+						+						-					
<i>Streptococcus s. mutans</i>		-					-						-						-						-						-					
<i>Bacillus subtilis</i>		+					+						+						+						+						-					
<i>Coliformes aerobios</i>		+					-						-						-						-						-					
<i>Shigella flexneri</i>		-					-						-						-						-						-					
<i>Salmonella typhi</i>		-					-						-						-						-						-					
<i>Escherichia coli</i>		-					-						-						-						-						-					
<i>Moraxella pneumoniae</i>		-					-						-						-						-						-					

Cuadro. 3 Resultado del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Schinus molle* y *Aloysia triphylla* frente a las bacterias patógenas en las diferentes concentraciones.

Microorganismos	ESTRUCTURA Y CONCENTRACION									
	Corteza de <i>Punica granatum</i>					Hoja de <i>Punica granatum</i>				
	Concentración mg/MI									
	60	90	120	200	250	60	90	120	200	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium xerosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro.4. Resultado del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Punica granatum* frente a las bacterias patógenas en diferentes concentraciones

Efecto inhibitorio de los diferentes extractos etanólicos de las plantas en estudio frente a diferentes concentraciones y especies bacterianas.

A continuación, se presenta el efecto inhibitorio a concentraciones de 60, 90, 120, 200 y 250 mg/mL, utilizando los extractos etanólicos de *Punica granatum* (hoja y corteza), *Schinus molle* (hoja, corteza y fruto) y *Aloysia triphylla* (hoja con flor) frente a algunas bacterias (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi*).

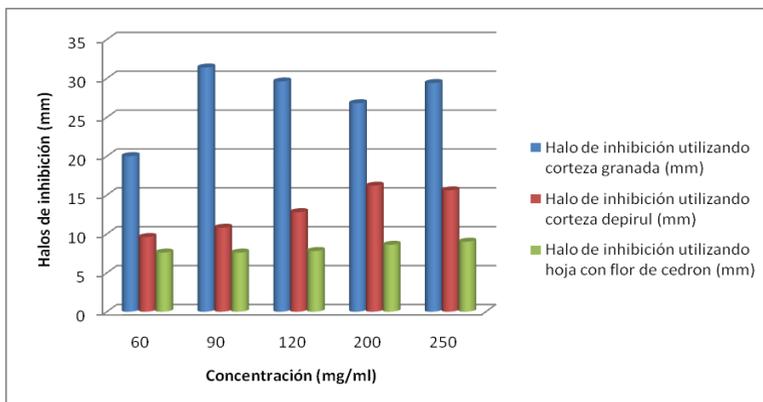


Figura 6. Halos de inhibición (mm) presentados por *Streptococcus agalactiae* frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza de *Punica granatum*, corteza de *Schinus molle* y hoja con flor de *Aloysia triphylla*.

En la figura 6 se observa que el extracto de corteza de *Punica granatum* tienen un mayor efecto inhibitorio a una concentración de 90 mg/mL que los de corteza de *Schinus molle* y hoja con flor de *Aloysia triphylla* frente a *S. agalactiae*.

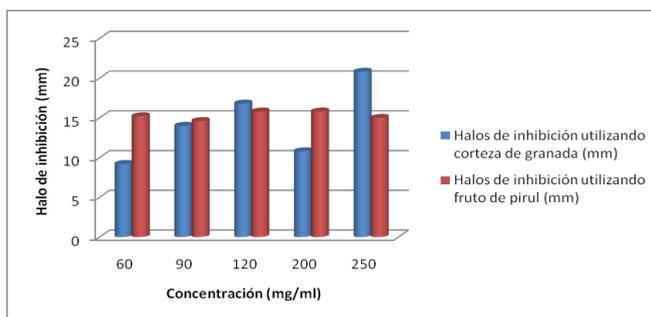


Figura 7. Halos de inhibición (mm) presentados por *Streptococcus pyogenes* frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza de *Punica granatum* y fruto de *Schinus molle*.

En la figura 7, La corteza de *Punica granatum* y el fruto de *Schinus molle* muestran una respuesta muy semejante frente a *Streptococcus pyogenes*.

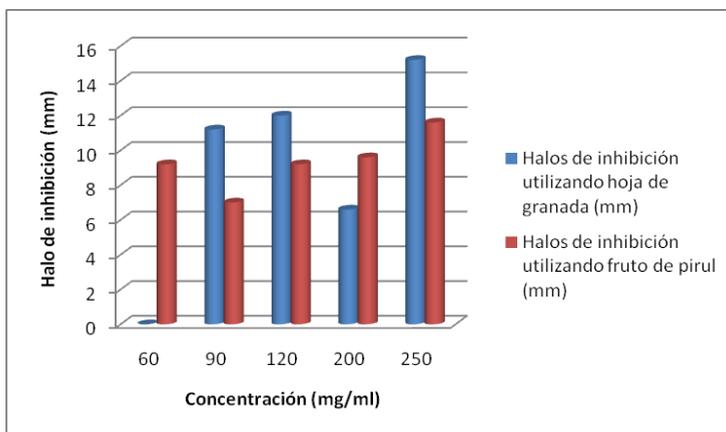


Figura 8. Halos de inhibición (mm) presentados por *Streptococcus mutans* frente a diferentes concentraciones de extractos de hoja de *Punica granatum* y fruto de *Schinus molle*.

En la figura 8, se observa el efecto antibacteriano del fruto de *Schinus molle*, que inicia a los 60 mg/mL, mientras que el efecto de la hoja comienza a los 90 mg/mL y manteniendo siempre el mejor efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*

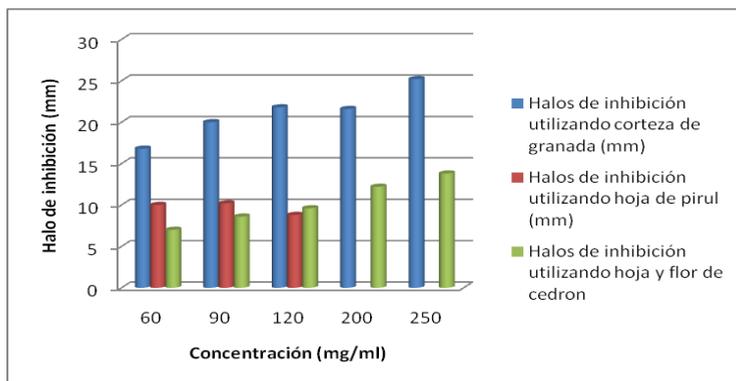


Figura 9. Halos de inhibición (mm) presentados por *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza de *Punica granatum*, hoja de *Schinus molle* y hoja con flor de *Aloysia triphylla*.

En la figura 9, se observa que el efecto antibacteriano de la corteza de *Punica granatum* fue mayor que el exhibido por la hoja de *Schinus molle* y la hoja con flor del *Aloysia triphylla*, frente a *Staphylococcus aureus*.

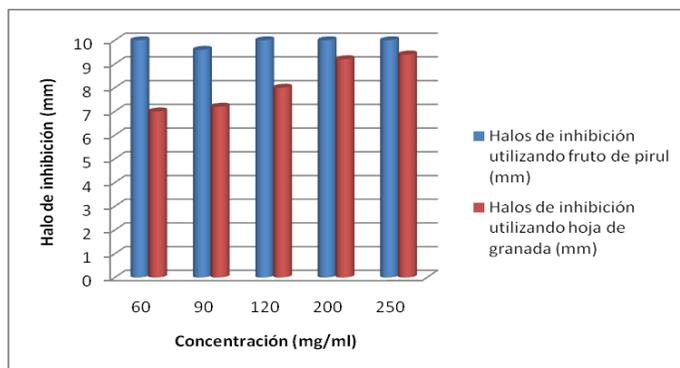


Figura 10 Halos de inhibición (mm) presentados por *Bacillus subtilis* frente a diferentes concentraciones de extractos del fruto de *Schinus molle* y hoja de *Punica granatum*.

En la figura 10, se observa el efecto de fruto de *Schinus molle*, que mostró una respuesta muy parecida en las concentraciones ensayadas, en cambio, la hoja de *Punica granatum* aumentó su efecto a medida que aumentó la concentración frente a *Bacillus subtilis*.

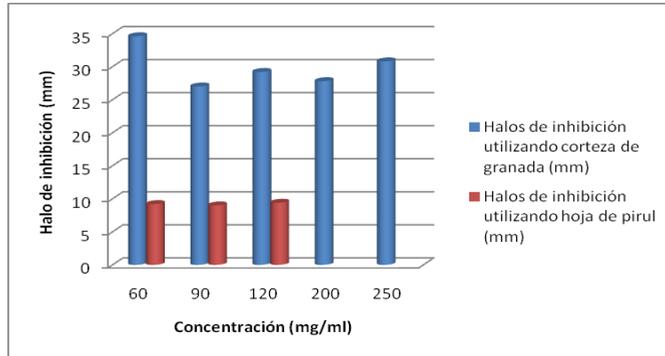


Figura 11. Halos de inhibición (mm) presentados por *Corynebacterium xerosis* frente a diferentes concentraciones de extractos corteza de *Punica granatum* y hoja de *Schinus molle*.

En la figura 11, se muestra que el efecto inhibitorio producido por la corteza de *Punica granatum* es más acentuado, que el exhibido por la hoja de *Schinus molle*, a las concentraciones de 60, 90, y 120 mg/mL

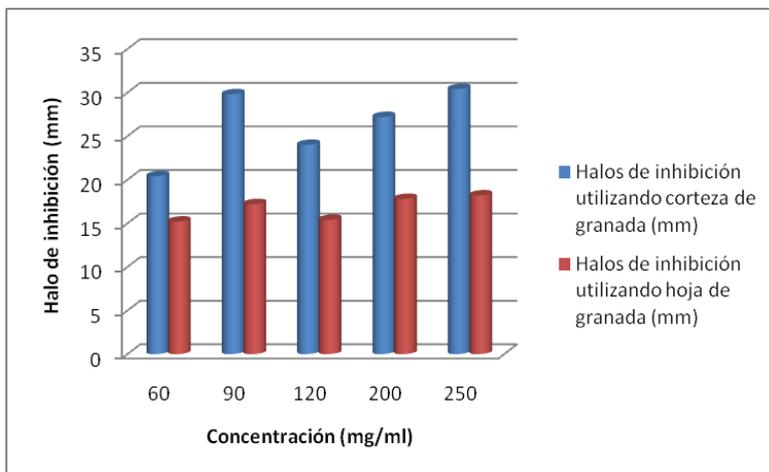


Figura 12. Halos de inhibición (mm) presentados por *Shigella flexneri* frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza y hoja de *Punica granatum*.

En la figura 12, se observa que la corteza de *Punica granatum* tiene mejor efecto antibacteriano, fue en aumento a medida que se incrementaba la concentración, mientras que la hoja de *Punica granatum* se mantiene constante frente a *Shigella flexneri*.

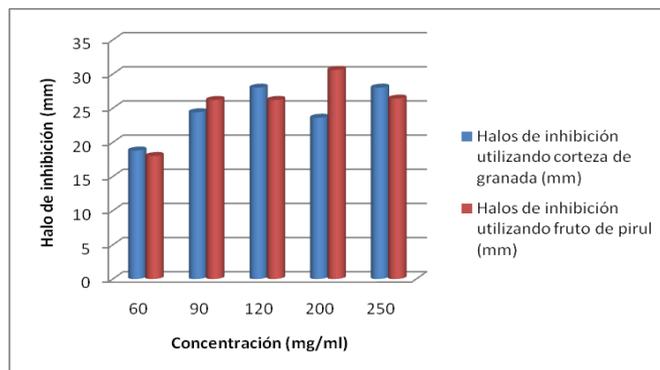


Figura 13 Halos de inhibición (mm) presentados por *Salmonella typhi* frente a diferentes concentraciones de extractos de corteza de *Punica granatum* y fruto de *Schinus molle*.

En la figura 13, se observa que el efecto inhibitorio de la corteza de *Punica granatum* y el fruto de *Schinus molle* fueron muy parecidos, frente a *Salmonella typhi*.

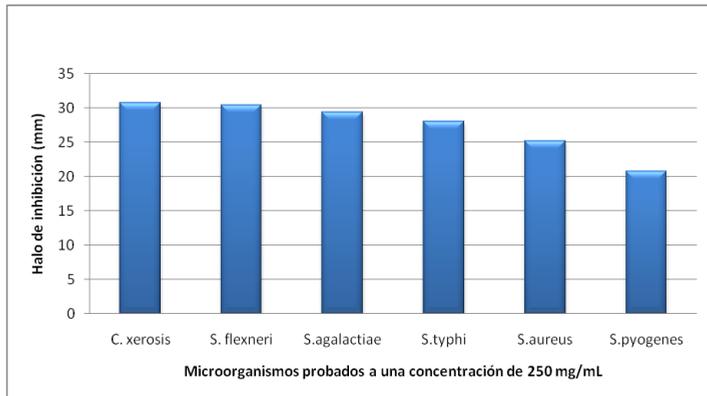


Figura 14. Comparación del efecto inhibitorio a una concentración de 250 mg/mL de la corteza de *Punica granatum* frente a diferentes microorganismos.

En la figura 14, se muestra una comparación de diferentes cepas bacterianas sometidas a una concentración de 250 mg/mL, en la que *Corynebacterium xerosis*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus agalactiae* y *Salmonella typhi* resultaron ser sensibles al extracto etanólico de corteza de *Punica granatum*; con menor respuesta las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Finalmente resultó ser resistente la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans*.

El desglose estadístico se presenta en el apéndice.

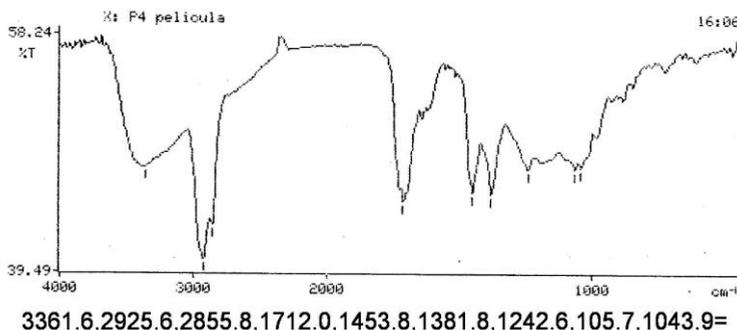
GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EL IR

Los resultados relacionados con el análisis del espectro IR, se muestran a continuación.

Hoja de pirul (*Schinus molle*)

El espectro de IR del extracto etanólico de hoja de pirul (Figura 15) muestra una señal a 3361.6 cm^{-1} asignada a la vibración O-H, esta señal asociada a la de 1712 cm^{-1} para un grupo carbonilo nos permite asegurar la presencia de ácido carboxílico, la señal que se muestra como en hombro a de 1725 cm^{-1} asociada a la de 1242 cm^{-1} y la de 1065.7 cm^{-1} nos indica la presencia de esteres fenólicos y alifáticos respectivamente. Las señales a 2925.6 , 1453.8 , 1381.8 cm^{-1} , comprueban la presencia de alguna estructura tipo alcano (CH_3 , CH_2 , etc.). La señal ancha a 3361.6 cm^{-1} para el enlace O-H asociada a la señal de 1242.6 indica la presencia de grupo fenol, está misma señal asociada a la de 1065.7 y 1043.9 cm^{-1} nos indican la presencia de alcoholes primarios.

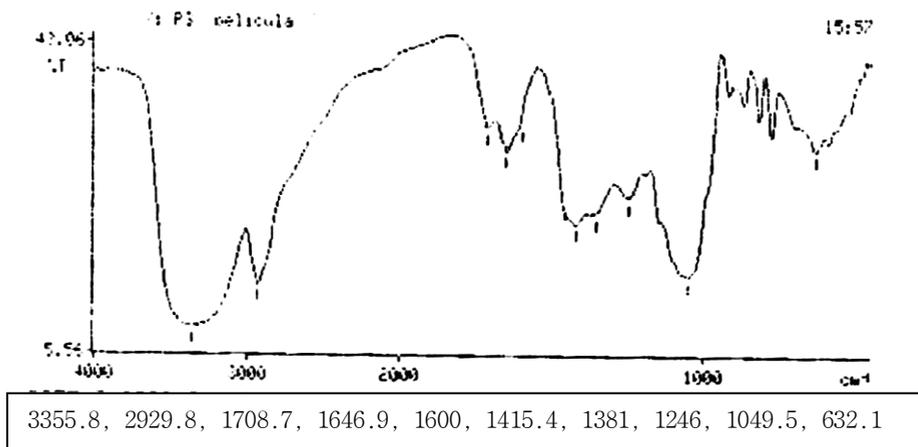
Figura 15. Espectro IR de hoja de pirul (*Schinus molle*)



Corteza de pirul (*Schinus molle*)

En el espectro en el IR para el extracto etanólico de la corteza de pirul (Figura 16) se observa una señal ancha e intensa a 3355.8 cm^{-1} , asignada a la vibración del enlace O-H, esta señal junto con las señales de 1246 cm^{-1} y 1049.5 cm^{-1} , indican la presencia de grupos funcionales de fenol y alcohol primario respectivamente. La señal de 2929.8 cm^{-1} junto con las señales de 1415.4 cm^{-1} y 1351 cm^{-1} , se asignan a cadenas alifáticas. Las señales de 1708.7 cm^{-1} , 1646.9 cm^{-1} , y 1600 cm^{-1} es posible asignarlas a la presencia de grupos amida I y II respectivamente

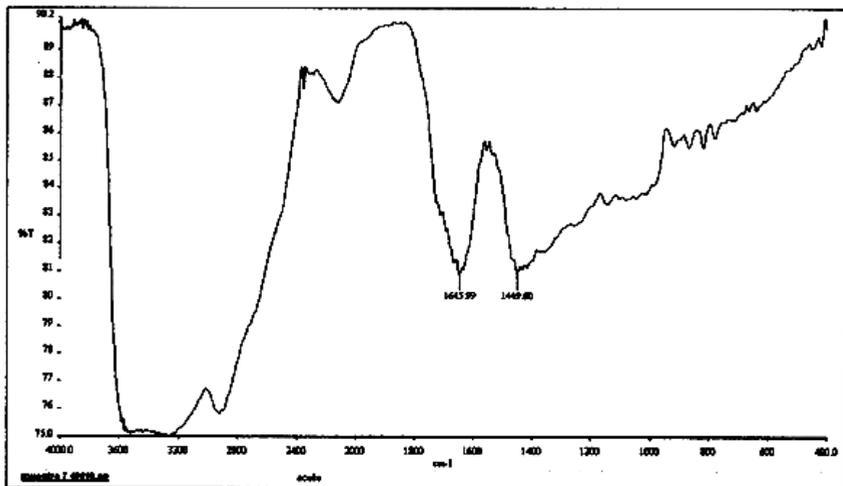
Figura 16. Espectro IR de Corteza de pirul (*Schinus molle*)



Fruto de pirul (*Schinus molle*)

La señal intensa y ancha que se observa en el espectro IR (Figura 17) a 3600 cm^{-1} se debe a la presencia de grupos O-H de tipo alcohol, no se observa la señal de carbonilo lo que indica ausencia de ácidos carboxílicos. Se presenta una señal aproximadamente a 2900 cm^{-1} y que asociada a la de 1449.6 cm^{-1} son indicativas de la presencia de cadenas CH_3 y CH_2 de tipo alcano. La señal a 1645.99 cm^{-1} podría ser indicativa de la presencia de dobles enlaces en la cadena. La señal debida a dobles enlaces arriba de 3000 no se observa posiblemente porque la señal en esa región es una señal ancha.

Figura 17. Espectro IR de Fruto de *Schinus molle* (pirul)

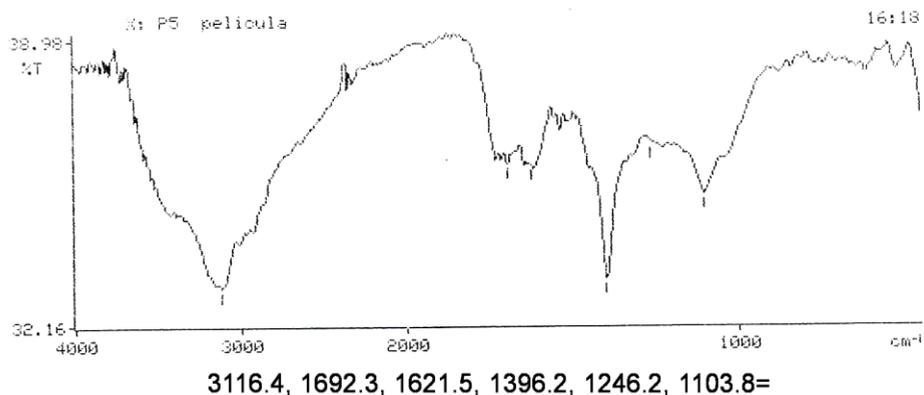


3600, 2900, 1645.99, 1449.6

Hoja de granada. (*Punica granatum*).

La señal en 3116.4 cm^{-1} es una señal intensa que asociada a las señales de 1692.3 y 1621.5 cm^{-1} nos permiten proponer que en estos compuestos orgánicos están presentes grupos amida secundaria como resultado de la reacción entre ácidos carboxílicos y aminas secundarias. Además la señal de 3116.4 y 1103.8 cm^{-1} son indicativas de la presencia de alcoholes secundarios. La señal a 1396.2 indica la presencia de grupos CH_3 posiblemente unidos a oxígeno $-\text{O}-\text{CH}_3$ (Figura 18).

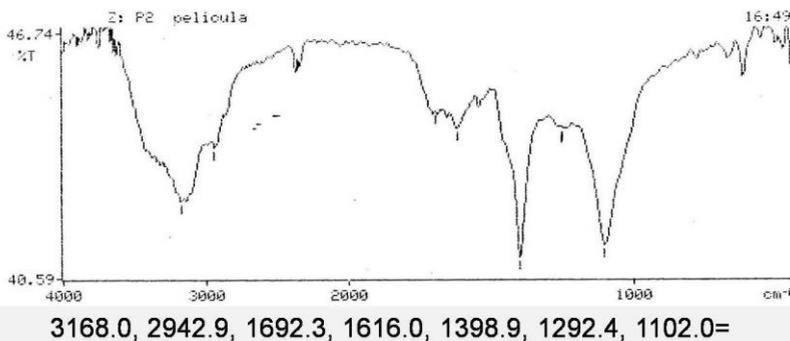
Figura 18. Espectro IR de Hoja de granada (*Punica granatum*)



Corteza de granada (*Punica granatum*).

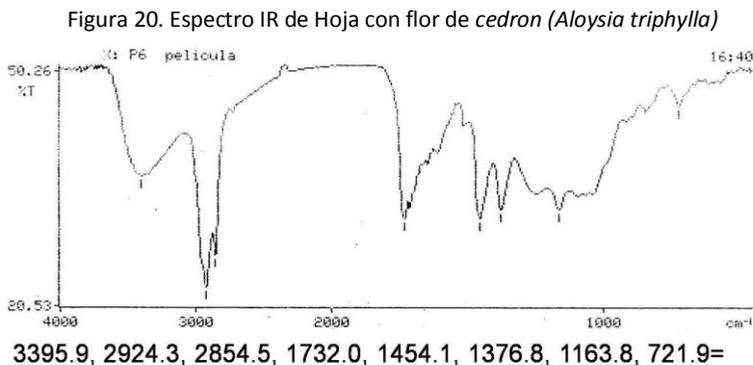
El espectro IR del extracto etanólico de corteza de granada (Figura 19) muestra la presencia de grupos O-H a 3168.0 cm^{-1} , esta señal asociada a la señal de 1102.0 cm^{-1} de manera similar a la observada en el espectro de hoja de granada son indicativas de la presencia de alcoholes secundarios, sin embargo comparando estas señales con las observadas en el espectro de la corteza la proporción relativa en cada espectro por separado es diferente, basado en esta observación en la corteza tenemos mayor presencia de grupos éter (-R-O-R- donde es probable que R sea un carbono secundario). La señal a 1398.9 cm^{-1} indica la presencia de grupos CH_3 posiblemente unidos a oxígeno O- CH_3 . Se observa la señal a 2942.9 cm^{-1} de cadena alifática.

Figura 19. Espectro IR de Corteza de granada (*Punica granatum*)



Hoja con flor de cedrón (*Aloysia triphylla*).

El espectro IR del extracto etanólico de hoja con flor de cedrón (Figura 20) muestra una señal a 3395.9 cm^{-1} , debida al enlace O-H que asociada a la señal de carbonilo a 1732.0 cm^{-1} nos indican la presencia de ácido carboxílico. Esta señal de 3395.9 cm^{-1} junto con la señal a 1163.8 cm^{-1} nos indica la presencia de alcoholes terciarios. Para este compuesto el espectro nos muestra que las señales más intensas se observan a 2924.3 , y 2854.5 cm^{-1} y debido a la señal a 721.9 cm^{-1} , concluimos la presencia de cadenas alifáticas de de más de cuatro metilenos ($-\text{CH}_2-$), se observan también las señales a 1454.1 y 1376.8 cm^{-1} , debidas a CH_3 y CH_2 .



DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La planta *Punica granatum* ha sido estudiada en diversos trabajos de investigación como en el de Naz, (2007), en el aislamiento del extracto metanólico de la fruta de *Punica granatum* con actividad antibacteriana la cual exhibe una actividad significativa contra especies de *Corynebacterium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella* y *Salmonella*. La razón de la actividad antibacteriana se atribuyó a su estructura fenólica; sin embargo otra especie como *E coli*, Naz observó el mismo efecto que las especies enunciadas anteriormente, mientras que en este trabajo no tuvo efecto inhibidor para *E coli* (55).

Al-Zoreky (56), (2009) reporta la actividad antimicrobiana de la *Punica granatum* contra algunos patógenos transmitidos por los alimentos, observándose que el 80% de extracto metanólico es un potente inhibidor frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* con una CMI de 4 mg/mL El trabajo de Al-Zoreky reveló que en el análisis fitoquímico hay presencia de compuestos fenólicos y flavonoides como inhibidores activos en la cáscara de *Punica granatum*

Bele, AA encontró, que en la preparación de un gel a base de hierbas, éste tiene un potente efecto antibacteriano, en los extractos crudos del pericarpio de *Punica granatum* y *Cúrcuma longa* los cuales mostraron actividad antibacteriana frente a diferentes cepas de Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *microorganismos Gram negativos* como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*.

Encontrándose que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Punica granatum* varía de 0.05 a 3.2 mg/mL con un halo de inhibición de 0.5, 1, 2.5, de los cuales, el 5% mostró la máxima zona de inhibición, (que van de 20.2 a 26 mm), comparada con la preparación comercial. La investigación reveló que la formulación de éste gel tiene una actividad antibacteriana potencial (57). Éste trabajo demostró que el 50% de los aislamientos tienen un efecto inhibitor mayor de 20mm que coincide con lo encontrado por Bele.⁵⁵⁻⁵⁷

En diversas investigaciones se ha reportado que el *Schinus molle* tiene efecto antibacteriano, como lo muestran Molina-S 2007, en su estudio de “El efecto antibacteriano de las plantas del norte de México”, donde se obtuvieron extractos acuosos y orgánicos probados con cepas resistentes a los medicamentos, utilizando la técnica de micro dilución en caldo, en donde los extractos orgánicos presentaron actividad antimicrobiana. El extracto hexanico de fruto de *Schinus molle* frente a *Streptococcus pneumoniae* mostró actividad antimicrobiana, con una (CMI) de 62.5µg/ mL respectivamente. Esta investigación viene a confirmar nuestros resultados del efecto antibacteriano de *Schinus molle* frente a las bacterias en estudio (58).

En el espectro IR de *Aloysia triphylla* en la señal de 2924.3 y 2854.5 cm^{-1} y debido a la señal 721.9 cm^{-1} hay presencia de cadenas alifáticas de más de cuatro metilenos como lo establece los experimentos de Ali, (2008) donde evaluó los componentes volátiles y la capacidad de barrido de radicales libres con la actividad antimicrobiana del extracto de la hoja de cedrón (*Aloysia triphylla*). Donde reportaron que los componentes volátiles de *Aloysia triphylla* fueron extraídos por el método de destilación y determinado por cromatografía de gases,

espectrometría de masas; y su aceite esencial se puso a prueba contra seis bacterias Gram positivas, Gram negativas y cuatro hongos fitopatógenos, el aceite esencial de *Aloysia triphylla* exhibió una interesante actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, pero no contra las Gram negativas, y una inhibición parcial frente a los hongos fitopatógenos. Duarte (2007), experimentó con plantas medicinales de Brasil entre las cuales está *Aloysia triphylla* y observó la actividad de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* contra 13 serotipos diferentes de la bacteria *Escherichia coli*, se determinó la CMI por el método de micro dilución en tubo y se observó que los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* muestran un buen potencial para inhibir moderadamente *Escherichia coli*. Demo, (2003) en su experimento, sobre la actividad antimicrobiana y anti fúngica de los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas de la Argentina, utiliza nueve bacterias y una levadura, para la prueba antibacteriana, se usó el método de difusión en disco, obteniendo que las bacterias, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* fueron inhibidas por los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*⁵⁹⁻⁶¹

Escherichia coli y *Klebsiella pneumoniae* son productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), ésta producción ha sido un mecanismo de resistencia en especial de estas dos cepas bacterianas contra las cuales hubo resistencia a los extractos etanólicos de *Punica granatum*, *Schinus molle* y *Aloysia triphylla*.

CONCLUSIONES

El extracto en peso seco que presentó el mejor rendimiento fue en hoja de *Punica granatum*, seguido de hoja de *Schinus molle* y hoja con flor de *Aloysia triphylla*.

La CMI se detectó a partir de 60 mg/mL en la mayoría de los extractos, excepto en la hoja de *Punica granatum*, frente a *Streptococcus mutans*, que fue a partir de 90 mg/mL.

El mejor efecto inhibitorio se presentó a una concentración de 250 mg/mL en la corteza de *Punica granatum*, frente a Gram negativos (*Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*) y Gram positivos (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium xerosis*).

A 250 mg/mL la corteza de *Punica granatum*, tuvo efecto de manera intermedia, sobre Gram positivo (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*).

Escherichia coli y *Klebsiella pneumoniae*, mostraron resistencia frente a todos los extractos.

Bacillus subtilis mostró resistencia a corteza de *Punica granatum* pero fue sensible a hoja de *Punica granatum* con un halo de inhibición de 9.4 mm y a fruto de *Schinus molle* con un halo de inhibición de 10 mm, siendo estos halos inferiores al de los otros microorganismos.

El efecto inhibitor de corteza de *Punica granatum* se debe probablemente a la presencia de grupos fenólicos presentes en el IR.

El efecto inhibidor del extracto de *Schinus molle* y *Aloysia triphylla* probablemente se debe a la presencia de grupos fenólicos y de alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas esteres y ácidos (contenidos en los aceites esenciales), presentes en el IR.

SUGERENCIAS.

Realizar pruebas de toxicidad a estas concentraciones.

Utilizar C.M.I. menor de 60 mg/mL

Realizar prueba del índice fenólico como referencia al efecto inhibidor de los diferentes extractos.

Efectuar los procedimientos de separación y purificación para relacionar con precisión, cuáles son las sustancias que causan el efecto observado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Háuad Marroquín L. Manual de Fitoterapia. México: Trillas; 2010.
2. Deepok Chopra D S. Manual de plantas medicinales. España: Paidós; 2001.
3. Barnes J, Anderson Linda A, Phillipson David J. Plantas Medicinales. Barcelona: Pharma; 2005.
4. Estrada E, Lara A. Sistema Nervioso y Herbolario. México: Universidad Autónoma Chapingo. Fórmulas Herbolarias Ediciones; 2008.
5. Cass H. Hierbas Medicinales. Madrid: Nowtilus; 2008.
6. Ville A. Biología. México: Mc Graw-Hill; 2002.
7. Haya Palazuelos F J. Uso Práctico de la Fitoterapia en Ginecología. Madrid: Panamericana; 2006.
8. Huerta Jaramillo AMD. Los Boticarios Poblanos. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2008.
9. Ratera Enrique L. Plantas de la Flora Argentina empleadas en medicina popular. Argentina: Hemisferio sur; 1980.
10. Islas Pérez V, Sánchez Ruiz JF. Breve Historia de la Farmacia en México y en el Mundo. México: Asociación Farmacéutica Mexicana; 1992.
11. Cebrián Jordi T. Diccionario integral de plantas medicinales. Barcelona: integral; 2002.

12. Cruz, S.J., Más de 100 plantas medicinales, Islas Canarias, 2007, pp. 28-29, disponible en: <http://www.fitoterapia.net/biblioteca/pdf/100PM.pdf> fecha de consulta 2/07/2014.
13. Chiereghin P. Farmacia Verde (Manual Práctico de Herboristería). Madrid: AMV Ediciones: Mundi-Prensa; 2000.
14. Rodríguez Ortega J J. Experto en Fitoterapia. Alcalá: Formación Alcalá; 2005.
15. Robbers James E, Tyler Varro E. Las Hierbas Medicinales de Tyler. España: Acribia; 2003.
16. Cano Carmona E. Flora Medicinal y Aromática. Jaen: Universidad de Jaén; 2007.
17. Flores R. Plantas medicinales curativas. Madrid: Cultural; 2006.
18. Rodríguez Junta M J Curso Experimental en Química Orgánica. Madrid: Síntesis; 2008.
19. Kuklinski Köppl C. Farmacognosia. Barcelona: Omega; 2003.
20. Mora J, Grass L, Maestre S, Todolí L J. Introducción a la experimentación en Química Analítica. Campus de San Vicente: Universidad de Alicante; 2005.
21. La Cuesta Martínez P J de. Operaciones de separación en ingeniería química. Madrid: Pearson Prentice Hall; 2004.

22. M Ramos Gallegos M^a del, Vargas Fernández. C. Laboratorio de Química Orgánica. Madrid: Centro de Estudios Ramón Areces; 2006.
23. Cecchini T, Ticli B. El libro de las hierbas medicinales. Barcelona: De Vecchi; 2004.
24. Bautista L C, Varon C A, Vázquez Gil O. La Biblia de las frutas y plantas medicinales. Colombia: Diseli; 2010.
25. Durán Ramírez F. Plantas aromáticas y medicinales. Bogotá: Grupo Latino Editores; 2009.
26. Ángela, G.V., Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas, Colombia, 2004, pp.8-9 disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandrea_gonzalezvilla.2004.pdf **consultada 24-04-2014**
27. Climent Olmedo M J, García Gómez H, Chornet Iborra S, Bertameu Morera I. Experimentación en química, química orgánica, ingeniería química. Valencia: Editorial de la UPV; 2005.
28. Solomons Graham T W. Química Orgánica. 2 ed. México: Limusa Wiley; 2007.
29. www.iztapalapa.df.gob.mx/htm/geografia.htm l. Consultada el 11 de abril de 2014.
30. Jorge Alonso. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Argentina: Corpus; 2007.
31. Ahmed Elmeleigy Y. Microbiología de los alimentos. España: Acribia; 2006.

32. Luis González Trigueros. Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. Madrid: Mc-Graw- Hill- Interamericana de España; 2003.
33. R Zaragoza, C Gimeno, J Peman, M Salavert. Microbiología Aplicada al Paciente Crítico. Buenos Aires: Medico-Panamericana; 2007.
34. Jawetz M. y Adelberg. Microbiología Médica. México: Mc Graw Hill; 2011.
35. Patrick R Murray, PhD, Kens S Rosenthal, PhD, Michael A Pfaller, MD. Microbiología Médica. 5 ed. Barcelona: Elsevier: 2006.
36. J Bedoya Avalos A de, Flores Acosta O A, Olguín Martínez G. Evaluación de la calidad de los productos farmacéuticos. Medellín: Universidad de Antioquia; 2011.
37. Granados Pérez Raquel, Villaverde Peris M^a C. Microbiología 1. Madrid: Thomson-Paraninfo; 2002.
38. Molina López J, Manjarrez Zavala Ma E, Tay Zavala J. Microbiología, Bacteriología y Virología. México: Méndez Editores; 2010.
39. Osuna Torres L, Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Barcelona: Publicaciones I Ediciones de la Universidad de Barcelona; 2005.
40. Nafees Ahmad, PHD, W Lawrence Drew, MD, PHD, James J, Plarde, MD. Microbiología Médica Sherris. 5 ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011.

41. Gilberto Ángel M. Interpretación Clínica de Laboratorio. 6 ed. Santafé de Bogotá: Médica Internacional LTDA; 2000.
42. Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2 ed. Madrid: Mc Graw-Hill-Interamericana de España; 2002.
43. Eugene Nester W, Denise Anderson G, Evans Roberts C Jr. Microbiología humana. México: El Manual Moderno; 2007.
44. Singleton P. Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina. 5 ed. España: Acribia; 2004.
45. Delaat N C A. Microbiología. 2 ed. México: Interamericana; 1979.
46. R Pascual Anderson M del, Calderon V, y P. Microbiología alimentaria. 2 ed. Madrid: Díaz de Santos; 2000.
47. R Bibek, Bhunia A. Fundamentos de Microbiología de los alimentos. 4 ed. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2010.
48. Cuenca R J. Evaluación del Efecto Antimicrobiano y Toxicidad del Extracto de *Alnus acuminata* subespecie arguta (Schlecht), H.B.K. (Tesis Licenciatura). México: UNAM; 2008.
49. Forbes B. Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
50. Tood Sanford D. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. España: Salvat Editores; 2009.

51. Kóneman E, W Allen. Diagnóstico Microbiológico. 3 ed. México: Panamericana; 2008.
52. Bailey & Scott. Diagnostico Microbiológico. 11 ed. Argentina: Panamericana; 2004.
53. Mendoza NV, Romo PM, Sánchez RM. Introducción a la Metodología. México: FES Zaragoza-UNAM; 2004.
54. Cervantes Sandoval A, Rivera García P, Paz López J.M de la. Estadística práctica para el análisis de datos SPSS, Una herramienta para el análisis estadístico de datos. México: U.N.A.M. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2004.
55. Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool S A, Sayeed S A. Antibacterial activity directed isolation of compounds from Punica granatum. Journal of food science 2007 Nov; 72(9):341-345.
56. Al Zoreky N S. Antimicrobial activity of pomegranate fruit peels. Journal 2009; 3: 244-248.
57. Bele A A, Jadhav VM, Nikam S R, Kadam V J. Antibacterial Potential of Herbal Formulation Research Journal of Microbiology 2009; April 4; (4): 164-167.
58. Molina-Salinas G M, Pérez López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Torres Said Fernández S de , N Waksman Duarte. Evaluation of the flora of northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity Journal of ethno pharmacology 2007; 109 (3): 435-441.

59. Ali HFM; El Beltagi HS, Nasr NF. Assessment of Volatile Components, Free Radical Scavenging Capacity and Anti-Microbial Activity of Lemon Verbena Leaves. *Research Journal of Phytochemistry* 2008; 2 (2): 84-92.
60. Duarte M C T, Leme E E, Delarmelina C, Soares A A, Figueira G M, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli* *Journal of Ethno pharmacology* 2007; 111(2): 197-201.
61. Las M Demo M de, Oliva M, López ML, Zunino MP, Zygadlo JA. Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Aromatic Plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology*.2005; 43 (2): 129-13

APÉNDICE

I Análisis estadístico de corteza de Punica granatum frente a Corynebacterium xerosis

Prueba de rango múltiples de CGC(xer) por concentración.

Concentración	frecuencia	media	grupos homogéneos
60	5	10.23	X
90	5	10.305	XX
200	5	10.395	XX
120	5	10.465	XX
250	5	10.52	X

Contraste	Diferencia	+/-Límites
60 - 90	-0.075	0.245312
60 - 120	-0.235	0.245312
60 - 200	-0.165	0.245312
60 - 250	*-0.29	0.245312
90 - 120	-0.16	0.245312
90 - 200	-0.09	0.245312
90 - 250	-0.215	0.245312
120 - 200	0.07	0.245312
120 - 250	-0.055	0.245312
200 - 250	-0.125	0.245312

* Denota una diferencia estadísticamente significativa porque $p < 0.05$.

2.- Análisis estadístico de corteza de *Punica granatum*, frente a *Staphylococcus aureus*

Prueba de rango múltiples de CGSaur por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	8.22	X
90	5	9.475	XX
200	5	9.9	X
120	5	9.915	X
250	5	10.26	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	-1.255	1.29421
60 - 120	*-1.695	1.29421
60 - 200	*-1.68	1.29421
60 - 250	*-2.04	1.29421
90 - 120	-0.44	1.29421
90 - 200	-0.425	1.29421
90 - 250	-0.785	1.29421
120 - 200	0.015	1.29421
120 - 250	-0.345	1.29421
200 - 250	-0.36	1.29421

* denotes a statistically significant difference.

3.- Análisis estadístico de corteza de *Punica granatum* frente a *Streptococcus agalactiae*

Prueba de rango múltiples de CGSagal por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	10.0	X
90	5	10.375	X
200	5	10.395	XX
250	5	10.475	X
120	5	10.48	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	*-0.375	0.0993849
60 - 120	*-0.48	0.0993849
60 - 200	*-0.395	0.0993849
60 - 250	*-0.475	0.0993849
90 - 120	*-0.105	0.0993849
90 - 200	-0.02	0.0993849
90 - 250	*-0.1	0.0993849
120 - 200	0.085	0.0993849
120 - 250	0.005	0.0993849
200 - 250	-0.08	0.0993849

* denotes a statistically significant difference.

4.- Análisis estadístico de corteza de *Punica granatum* frente a *Shigella flexneri*

Prueba de rango múltiples de CGShflex) por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	9.94	X
120	5	10.205	XX
90	5	10.29	XX
200	5	10.365	X
250	5	10.525	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	-0.35	0.372449
60 - 120	-0.265	0.372449
60 - 200	*-0.425	0.372449
60 - 250	*-0.585	0.372449
90 - 120	0.085	0.372449
90 - 200	-0.075	0.372449
90 - 250	-0.235	0.372449
120 - 200	-0.16	0.372449
120 - 250	-0.32	0.372449
200 - 250	-0.16	0.372449

* denotes a statistically significant difference.

5.- Análisis estadístico de corteza de *Punica granatum* frente a *Salmonella typhi*

Prueba de rango múltiples de CGStyp) por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
60          5          8.145          X
200         5          10.185         X
90          5          10.27          X
120         5          10.35          X
250         5          10.4           X
-----
Contrast          Difference      +/- Limits
-----
60 - 90          -2.125         2.48503
60 - 120         -2.205         2.48503
60 - 200         -2.04          2.48503
60 - 250         -2.255         2.48503
90 - 120         -0.08          2.48503
90 - 200         0.085          2.48503
90 - 250         -0.13          2.48503
120 - 200        0.165          2.48503
120 - 250        -0.05          2.48503
200 - 250        -0.215         2.48503
-----
^ denotes a statistically significant difference.

```

6.- Análisis estadístico de corteza de *Punica granatum* de bacterias en total

Prueba de rango múltiples de CGbacterias en total por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
	Count	Mean	Homogeneous Groups
CGSaur	25	9.554	X
CGStyp	25	9.87	XX
CGShflex	25	10.265	X
CGSbeta	25	10.345	X
CGCxer	25	10.383	X

Contrast	Difference	+/- Limits
CGCxer - CGSaur	*0.829	0.573861
CGCxer - CGSbeta	0.038	0.573861
CGCxer - CGShflex	0.118	0.573861
CGCxer - CGStyp	0.513	0.573861
CGSaur - CGSbeta	*-0.791	0.573861
CGSaur - CGShflex	*-0.711	0.573861
CGSaur - CGStyp	-0.316	0.573861
CGSbeta - CGShflex	0.08	0.573861
CGSbeta - CGStyp	0.475	0.573861
CGShflex - CGStyp	0.395	0.573861

* denotes a statistically significant difference.

7.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Bacillus subtilis*

Prueba de rango múltiples de HGBsub por concentración.

Method: 95.0 percent LSD

concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	3.2	X
60	5	3.3	X
120	5	4.1	X
200	5	4.6	XX
250	5	4.75	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	0.1	0.551895
60 - 120	+0.8	0.551895
60 - 200	+1.3	0.551895
60 - 250	+1.45	0.551895
90 - 120	+0.9	0.551895
90 - 200	+1.4	0.551895
90 - 250	+1.55	0.551895
120 - 200	-0.5	0.551895
120 - 250	+0.65	0.551895
200 - 250	-0.15	0.551895

* denotes a statistically significant difference.

8.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Corynebacterium xerosis*

Prueba de rango múltiples de HGCxer por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean      Homogeneous Groups
-----
60          5          7.565      X
90          5          8.05       X
200         5          8.1        X
120         5          8.4        X
250         5          8.5        X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
60 - 90                  -0.485         2.44596
60 - 120                  -0.835         2.44596
60 - 200                  -0.535         2.44596
60 - 250                  -0.935         2.44596
90 - 120                   -0.35          2.44596
90 - 200                   -0.05          2.44596
90 - 250                   -0.45          2.44596
120 - 200                   0.3            2.44596
120 - 250                   -0.1           2.44596
200 - 250                   -0.4           2.44596
-----
* denotes a statistically significant difference.

```

9.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Staphylococcus aureus*

Prueba de rango múltiples de HGSaur por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
60          5          7.2          X
200         5          8.6          X
90          5          8.72         XX
120         5          8.8          XX
250         5          9.62         X
-----
Contrast          Difference      +/- Limits
-----
60 - 90          + -1.52        0.985319
60 - 120         + -1.6         0.985319
60 - 200         + -1.4         0.985319
60 - 250         + -2.42        0.985319
90 - 120         -0.08         0.985319
90 - 200         0.12          0.985319
90 - 250         -0.9          0.985319
120 - 200        0.2           0.985319
120 - 250       -0.82         0.985319
200 - 250       + -1.02        0.985319
-----
* denotes a statistically significant difference.

```

10.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Streptococcus agalactiae*

Prueba de rango múltiples de HGSagal por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	4.6	X
60	5	4.6	X
120	5	5.0	XX
200	5	5.25	XX
250	5	5.55	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	0.0	0.734545
60 - 120	-0.4	0.734545
60 - 200	-0.65	0.734545
60 - 250	*-0.95	0.734545
90 - 120	-0.4	0.734545
90 - 200	-0.65	0.734545
90 - 250	*-0.95	0.734545
120 - 200	-0.25	0.734545
120 - 250	-0.55	0.734545
200 - 250	-0.3	0.734545

* denotes a statistically significant difference.

11.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Streptococcus pyogenes*

Prueba de rango múltiples de HGSpyo por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	5.3	X
90	5	5.45	X
120	5	6.4	XX
200	5	6.8	X
250	5	9.635	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	-0.15	1.16803
60 - 120	-1.1	1.16803
60 - 200	*-1.5	1.16803
60 - 250	*-4.335	1.16803
90 - 120	-0.95	1.16803
90 - 200	*-1.35	1.16803
90 - 250	*-4.185	1.16803
120 - 200	-0.4	1.16803
120 - 250	*-3.235	1.16803
200 - 250	*-2.835	1.16803

* denotes a statistically significant difference.

12.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Streptococcus mutans*

Multiple Range Tests for H Prueba de rango múltiples de HGSmut por concentración

Method: 95.0 percent LSD

concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	0.37	X
90	5	0.4	XX
120	5	0.44	X
200	5	0.52	X
250	5	0.58	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	-0.03	0.0519402
60 - 120	*-0.07	0.0519402
60 - 200	*-0.15	0.0519402
60 - 250	*-0.21	0.0519402
90 - 120	-0.04	0.0519402
90 - 200	*-0.12	0.0519402
90 - 250	*-0.18	0.0519402
120 - 200	*-0.08	0.0519402
120 - 250	*-0.14	0.0519402
200 - 250	*-0.06	0.0519402

* denotes a statistically significant difference.

13.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Salmonella typhi*

Prueba de rango múltiples de HGStyp por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean      Homogeneous Groups
-----
60          5          9.035      X
250         5          9.8        XX
120         5          10.15     XX
90          5          10.235    XX
200         5          10.265    X
-----
Contrast          Difference      +/- Limits
-----
60 - 90          -1.2           1.20693
60 - 120         -1.115         1.20693
60 - 200         ^-1.23         1.20693
60 - 250         -0.765         1.20693
90 - 120          0.085         1.20693
90 - 200         -0.03         1.20693
90 - 250          0.435         1.20693
120 - 200        -0.115         1.20693
120 - 250         0.35          1.20693
200 - 250         0.465         1.20693
-----
^ denotes a statistically significant difference.

```

14.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum* frente a *Shigella flexneri*

Prueba de rango múltiples de HGShflex por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
60             5             6.71          X
120            5             7.255        XX
90             5             7.835        XX
200            5             8.125        XX
250            5             9.1          X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
60 - 90                  -1.125         2.36428
60 - 120                 -0.545         2.36428
60 - 200                 -1.415         2.36428
60 - 250                 *-2.39         2.36428
90 - 120                  0.58          2.36428
90 - 200                 -0.29          2.36428
90 - 250                 -1.265         2.36428
120 - 200                 -0.87          2.36428
120 - 250                 -1.845         2.36428
200 - 250                 -0.975         2.36428
-----
* denotes a statistically significant difference.

```

15.- Análisis estadístico de hoja de *Punica granatum de* bacterias totales

Prueba de rango múltiples de HGBact en total por concentración

Multiple range tests			
method: 95.0 percent L95			
	Count	Mean	homogeneous Groups
sgmaub	25	3.88	X
sgsmut	25	4.62	XX
sgsbeta	25	3.0	X
sgsppo	25	4.717	X
sgshflex	25	7.805	X
sgCnar	25	4.133	XX
sgsaur	25	4.588	X
sgstyp	25	4.887	X
Contrast		difference	+/- limits
sgmaub - sgCnar		**4.133	0.719094
sgmaub - sgsaur		**4.588	0.719094
sgmaub - sgsbeta		**1.01	0.719094
sgmaub - sgshflex		**3.815	0.719094
sgmaub - sgsmut		-0.63	0.719094
sgmaub - sgsppo		**2.727	0.719094
sgmaub - sgstyp		**5.907	0.719094
sgCnar - sgsaur		-0.445	0.719094
sgCnar - sgsbeta		-3.133	0.719094
sgCnar - sgshflex		0.318	0.719094
sgCnar - sgsmut		-3.203	0.719094
sgCnar - sgsppo		-1.408	0.719094
sgCnar - sgstyp		**1.774	0.719094
sgsaur - sgsbeta		-3.588	0.719094
sgsaur - sgshflex		-0.743	0.719094
sgsaur - sgsmut		-3.868	0.719094
sgsaur - sgsppo		-1.871	0.719094
sgsaur - sgstyp		**1.308	0.719094
sgsbeta - sgshflex		**2.805	0.719094
sgsbeta - sgsmut		0.38	0.719094
sgsbeta - sgsppo		**1.717	0.719094
sgsbeta - sgstyp		**4.887	0.719094
sgshflex - sgsmut		-3.185	0.719094
sgshflex - sgsppo		-1.088	0.719094
sgshflex - sgstyp		**2.082	0.719094
sgsmut - sgsppo		**2.087	0.719094
sgsmut - sgstyp		**5.277	0.719094
sgsppo - sgstyp		**3.18	0.719094

* denotes a statistically significant difference.

16.- Análisis estadístico de corteza de *Schinus molle* frente a *Streptococcus agalactiae*

Prueba de rango múltiples de CPSagal por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean      Homogeneous Groups
-----
90          5          5.4          X
120         5          6.4          XX
60          5          6.4          XX
250         5          7.8          XX
200         5          8.15         X
-----
Contrast      Difference      +/- Limits
-----
60 - 90          1.0          1.65503
60 - 120         0.0          1.65503
60 - 200        *-1.75        1.65503
60 - 250        -1.4          1.65503
90 - 120        -1.0          1.65503
90 - 200        *-2.75        1.65503
90 - 250        *-2.4          1.65503
120 - 200       *-1.75        1.65503
120 - 250       -1.4          1.65503
200 - 250        0.35         1.65503
-----
* denotes a statistically significant difference.

```

17.- Análisis estadístico de corteza de *Schinus molle* frente a *Bacillus subtilis*

Prueba de rango múltiples de CPBsub por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
200          5          4.1          X
120          5          4.1          X
90           5          4.15         X
250          5          4.15         X
60           5          4.85         X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
60 - 90                 +0.7           0.561664
60 - 120                +0.75          0.561664
60 - 200                +0.75          0.561664
60 - 250                +0.7           0.561664
90 - 120                0.05           0.561664
90 - 200                0.05           0.561664
90 - 250                0.0            0.561664
120 - 200               0.0            0.561664
120 - 250               -0.05          0.561664
200 - 250               -0.05          0.561664
-----
* denotes a statistically significant difference.

```

18.- Análisis estadístico de corteza de *Schinus molle* frente a *Streptococcus pyogenes*

Prueba de rango múltiples de CPSPyo por concentración.

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
120          5          4.3          X
90           4          4.8125       XX
200          5          5.25         XX
60           5          5.25         XX
250          5          5.75         X
-----
Contrast          Difference      +/- Limits
-----
60 - 90          0.4375         1.49693
60 - 120         0.95           1.41131
60 - 200         0.0            1.41131
60 - 250        -0.5           1.41131
90 - 120         0.5125         1.49693
90 - 200        -0.4375         1.49693
90 - 250        -0.9375         1.49693
120 - 200       -0.95           1.41131
120 - 250       ^-1.45          1.41131
200 - 250       -0.5            1.41131
-----
```

* denotes a statistically significant difference.

19.- Análisis estadístico de corteza de *Schinus molle* frente a bacterias totales

Prueba de rango múltiples de CPbact en total por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
	Count	Mean	Homogeneous Groups
CPBsub	25	4.27	X
CPSpyo	24	5.08333	X
CPbeta	25	6.83	X
Contrast			Difference +/- Limits
CPbeta - CPBsub			+2.56 0.635542
CPbeta - CPSpyo			+1.74667 0.642128
CPBsub - CPSpyo			+ -0.813333 0.642128

* denotes a statistically significant difference.

20.- Análisis estadístico de fruto de *Schinus molle* frente a

Prueba de rango múltiples de FPB_{sub} por concentración.

Multiple Range Tests for FPB_{sub} by concentraciones

 Method: 95.0 percent LSD

concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	4.8	X
120	5	5.0	X
200	5	5.0	X
250	5	5.0	X
60	5	5.0	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	0.2	0.263856
60 - 120	0.0	0.263856
60 - 200	0.0	0.263856
60 - 250	0.0	0.263856
90 - 120	-0.2	0.263856
90 - 200	-0.2	0.263856
90 - 250	-0.2	0.263856
120 - 200	0.0	0.263856
120 - 250	0.0	0.263856
200 - 250	0.0	0.263856

 * denotes a statistically significant difference.

21.- Análisis estadístico de fruto de *Schinus molle* frente a *Corynebacterium xerosis*

Prueba de rango múltiples de FPCxer por concentración.

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
60             2             4.0            X
120            5             4.2            X
200            5             4.4            X
90             4             4.5            X
250            5             4.95           X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
60 - 90                  -0.5           1.65803
60 - 120                 -0.2           1.60181
60 - 200                 -0.4           1.60181
60 - 250                 -0.95          1.60181
90 - 120                  0.3            1.28431
90 - 200                  0.1            1.28431
90 - 250                 -0.45          1.28431
120 - 200                 -0.2           1.21086
120 - 250                 -0.75          1.21086
200 - 250                 -0.55          1.21086
-----
```

* denotes a statistically significant difference.

22.- Análisis estadístico de fruto de *Schinus molle* frente a *Staphylococcus aureus*

Prueba de rango múltiples de FPSaur por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	4	3.5625	X
60	5	4.05	XX
120	5	4.65	XXX
250	5	4.75	XX
200	5	5.55	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	0.4875	1.09692
60 - 120	-0.6	1.03419
60 - 200	*-1.5	1.03419
60 - 250	-0.7	1.03419
90 - 120	-1.0875	1.09692
90 - 200	*-1.9875	1.09692
90 - 250	*-1.1875	1.09692
120 - 200	-0.9	1.03419
120 - 250	-0.1	1.03419
200 - 250	0.8	1.03419

* denotes a statistically significant difference.

23.- Análisis estadístico de fruto de *Schinus molle* frente a *Streptococcus pyogenes*

Prueba de rango múltiples de FPSpyo por concentración.

 Method: 95.0 percent LSD

concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	7.3	X
120	5	7.45	X
200	5	7.45	X
250	5	7.55	X
60	5	7.65	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	0.35	1.49769
60 - 120	0.2	1.49769
60 - 200	0.2	1.49769
60 - 250	0.1	1.49769
90 - 120	-0.15	1.49769
90 - 200	-0.15	1.49769
90 - 250	-0.25	1.49769
120 - 200	0.0	1.49769
120 - 250	-0.1	1.49769
200 - 250	-0.1	1.49769

 * denotes a statistically significant difference.

24.- Análisis estadístico de fruto de *Schinus molle* frente a *Salmonella typhi*

Prueba de rango múltiples de FPStyp por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	5	7.175	X
90	5	10.315	XX
120	5	10.385	XX
200	5	10.435	XX
250	5	12.4252	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	-3.14	3.61962
60 - 120	-3.21	3.61962
60 - 200	-3.26	3.61962
60 - 250	*-5.2502	3.61962
90 - 120	-0.07	3.61962
90 - 200	-0.12	3.61962
90 - 250	-2.1102	3.61962
120 - 200	-0.05	3.61962
120 - 250	-2.0402	3.61962
200 - 250	-1.9902	3.61962

* denotes a statistically significant difference.

25.- Análisis estadístico de fruto de *Schinus molle* de bacterias totales

Prueba de rango múltiples de FPbact en total por concentración.

```
-----
Method: 95.0 percent LSD

```

	Count	Mean	Homogeneous Groups
FPCKer	21	4.46429	X
FPSSaur	24	4.55208	X
FPBsub	25	4.96	X
FPSSpyo	25	7.48	X
FPStyp	25	10.147	X

```
-----

```

Contrast	Difference	+/- Limits
FPBsub - FPCKer	0.495714	0.924021
FPBsub - FPSSaur	0.407917	0.892082
FPBsub - FPSSpyo	*-2.52	0.882932
FPBsub - FPStyp	*-5.18704	0.882932
FPCKer - FPSSaur	-0.0877976	0.932767
FPCKer - FPSSpyo	*-3.01571	0.924021
FPCKer - FPStyp	*-5.68275	0.924021
FPSSaur - FPSSpyo	*-2.92792	0.892082
FPSSaur - FPStyp	*-5.59496	0.892082
FPSSpyo - FPStyp	*-2.66704	0.882932

```
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

26.- Análisis estadístico de hoja de *Schinus molle* frente a *Bacillus subtilis*

Prueba de rango múltiples de HPBsub por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
120	5	4.55	X
60	5	4.6	X
90	5	4.7	X
200	4	4.8125	X
250	4	6.3125	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	-0.1	0.934
60 - 120	0.05	0.934
60 - 200	-0.2125	0.990657
60 - 250	*-1.7125	0.990657
90 - 120	0.15	0.934
90 - 200	-0.1125	0.990657
90 - 250	*-1.6125	0.990657
120 - 200	-0.2625	0.990657
120 - 250	*-1.7625	0.990657
200 - 250	*-1.5	1.04424

* denotes a statistically significant difference.

27.- Análisis estadístico de hoja de *Schinus molle* frente a *Streptococcus agalactiae*

Prueba de rango múltiples de HPSagal por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
60             4             3.8           X
120            5             4.06          X
200            5             4.34          X
90             4             4.6875       XX
250            5             5.82          X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
60 - 90                 -0.8875        1.43366
60 - 120                -0.26          1.36009
60 - 200                -0.54          1.36009
60 - 250                ^-2.02         1.36009
90 - 120                0.6275        1.36009
90 - 200                0.3475        1.36009
90 - 250                -1.1325       1.36009
120 - 200               -0.28          1.28231
120 - 250               ^-1.76         1.28231
200 - 250               ^-1.48         1.28231
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

28.- Análisis estadístico de hoja de *Schinus molle* frente a *Corynebacterium xerosis*

Prueba de rango múltiples de HPC_{xer} por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
200          5          0.0          X
250          5          0.0          X
90           5          4.55         X
60           5          4.65         X
120          5          4.75         X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
60 - 90                  0.1            0.983949
60 - 120                 -0.1           0.983949
60 - 200                 +4.65          0.983949
60 - 250                 +4.65          0.983949
90 - 120                 -0.2           0.983949
90 - 200                 +4.55          0.983949
90 - 250                 +4.55          0.983949
120 - 200                +4.75          0.983949
120 - 250                +4.75          0.983949
200 - 250                0.0            0.983949
-----
* denotes a statistically significant difference.

```

29.- Análisis estadístico de hoja de *Schinus molle* frente a *Streptococcus pyogenes*

Prueba de rango múltiples de HPSpyo por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
concentracionesCount      Mean          Homogeneous Groups
-----
90          5          4.1          X
120         5          4.15         X
200         5          4.2          X
60          5          4.3          X
250         5          4.4          X
-----
Contrast          Difference      +/- Limits
-----
60 - 90          0.2            0.863853
60 - 120         0.15           0.863853
60 - 200         0.1            0.863853
60 - 250         -0.1           0.863853
90 - 120         -0.05          0.863853
90 - 200         -0.1           0.863853
90 - 250         -0.3           0.863853
120 - 200        -0.05          0.863853
120 - 250        -0.25          0.863853
200 - 250        -0.2           0.863853
-----
* denotes a statistically significant difference.

```

30.- Análisis estadístico de hoja de *Schinus molle* de bacterias totales

Prueba de rango múltiples de HP^bbact en total por concentración.

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
HPSPYO	25	4.23	X
HPCxer	15	4.65	XX
HPSbeta	23	4.94565	X
HPBsub	23	4.94565	X

Contrast	Difference	+/- Limits
HPBsub - HPCxer	0.295652	0.547201
HPBsub - HPSbeta	0.0	0.486201
HPBsub - HPSPYO	*0.715652	0.476278
HPCxer - HPSbeta	-0.295652	0.547201
HPCxer - HPSPYO	0.42	0.538492
HPSbeta - HPSPYO	*0.715652	0.476278

* denotes a statistically significant difference.

31.- Análisis estadístico de hoja con flor de *Aloysia triphylla* frente a *Staphylococcus aureus*

Prueba de rango múltiples de HCSaur por concentración.

Method: 95.0 percent LSD			
concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	3	3.58333	X
90	5	4.3	X
120	5	4.85	X
200	5	6.15	X
250	5	6.95	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	-0.716667	1.37905
60 - 120	-1.26667	1.37905
60 - 200	*-2.56667	1.37905
60 - 250	*-3.36667	1.37905
90 - 120	-0.55	1.1943
90 - 200	*-1.85	1.1943
90 - 250	*-2.65	1.1943
120 - 200	*-1.3	1.1943
120 - 250	*-2.1	1.1943
200 - 250	-0.8	1.1943

* denotes a statistically significant difference.

32.- Análisis estadístico de hoja y flor de *Aloysia triphylla*
frente a *Streptococcus agalactiae*

Prueba de rango múltiples de HCS agal por concentración.

Method: 95.0 percent LSD

concentraciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
90	5	3.8	X
60	5	3.85	X
120	5	3.9	X
200	5	4.4	XX
250	5	4.6	X

Contrast	Difference	+/- Limits
60 - 90	0.05	0.632705
60 - 120	-0.05	0.632705
60 - 200	-0.55	0.632705
60 - 250	*-0.75	0.632705
90 - 120	-0.1	0.632705
90 - 200	-0.6	0.632705
90 - 250	*-0.8	0.632705
120 - 200	-0.5	0.632705
120 - 250	*-0.7	0.632705
200 - 250	-0.2	0.632705

* denotes a statistically significant difference.

33.- Análisis estadístico de hoja con flor de *Aloysia triphylla*
de bacterias totales

Prueba de rango múltiples de HCbact en total por concentración.

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
      Count      Mean      Homogeneous Groups
-----
HCSbeta      25      4.11      X
HCS aureus   23      5.30435   X
-----
Contrast                                Difference      +/- Limits
-----
HCS aureus - HCSbeta                    *1.19435      0.629422
-----
* denotes a statistically significant difference.
  
```