



**Universidad Nacional Autónoma de México**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE *Echeveria gibbiflora* D.C. (CRASSULACEAE)**

**Tesis**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**DÍAZ ESCOBAR PEDRO ALFONSO**

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. Avila Romero Marisol

Los Reyes Iztacala,

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

Mayo, 2017





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.

## **Agradecimientos**

A México por mostrarme lo hermoso de la naturaleza, a su gente y cultura. Me ha enseñado que aunque siendo un país humilde siempre hay que mantener la cabeza en alto.

A la máxima casa de estudios de México, la UNAM por permitirme crecer, superarme y gozar de la vida académica bajo su techo.

A todos los profesores que inculcaron en mí su saber, ética y cultura. Sin su tutela no sería lo que soy hoy.

A la M. C. Avila Romero Marisol, por la guía incondicional, porque nunca me dijo no a cualquier duda que yo tuviera. Una gran inspiración para todos sus alumnos y una de las mejores maestras que puede tener la UNAM. Muchas gracias maestra Mari, por usted puedo decir que ahora soy Biólogo.

A la Dra. Ana María García Bores, por acogerme en el laboratorio, por su paciencia y guía, por las charlas con café, tardes de debates y más. Gracias por todo.

A la Dra. Rocio Serrano Parrales, por el tiempo que se tomó para guiarme, por sus aportaciones a este trabajo y porque simplemente el laboratorio no sería el mismo sin usted.

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado, Doc. Nani es una de las mejores personas que he conocido, su paciencia, dedicación y amor por la Biología es admirable.

Al Dr. José Guillermo Avila Romero. Doc. Memo gracias por las infinitamente interesantes clases que da. Su pasión por la ciencia es contagiosa y algún día quisiera poder decir que soy como usted.

A la Dra. Adriana Monserrat, Doc. Monc nunca cambie, su manera de ser, su perspectiva, la forma en como enseña. Porque siempre que llego al laboratorio me recibe con los brazos abiertos. Gracias.

A la Sra. Betty, porque más que una laboratorista, una parte fundamental de la familia del laboratorio. Gracias por las pláticas de la vida, sus consejos, sus cuidados hacia nosotros. Señora Betty muchas gracias.

A Kay, por ser una de esas raras personas que logran aguantar mi áspero ser, una amiga, alguien de la familia y por supuesto una gran científica.

A Maf y Georgi, su ayuda y apoyo fue crucial para mi tesis, las pláticas con ustedes, las horas en las campanas nunca las olvidare.

A Pillus y Miguel quienes desde primer año y sin prejuicios me brindaron su amistad. Los quiero mucho y espero siempre estar con ustedes, recuerden que para mí las distancias no importan y como ya lo hemos hecho antes, nos reuniremos y acompañaremos los unos a los otros.

Y a todos los que estuvieron conmigo durante tanto tiempo. Gracias Doña Oliva su interés por mi familia, sus charlas y convivencia. Y a todos los que se me olvidan muchas gracias

## Dedicatorias

A mi mamá, quien nunca se rindió, nunca dejó de pelear para darnos la mejor educación que ella pudo brindarnos a mi hermana y a mí. Porque se levantaba a las cuatro de la mañana todos los días para prepararnos el almuerzo para ir a la escuela y nunca se quejó de ello. Porque no faltó día que no trabajó hasta desfallecer para brindarnos los materiales que necesitábamos para la escuela. Porque no importo que ella fuera madre soltera, nunca nos descuidó y siempre nos guió con mano dura pero flexible, porque quiero decirme su hijo y porque lo soy. Simplemente no estaría aquí sin ella, por lo cual no solo le dedico esta tesis, si no que le dedico todos mis logros. De todo el esfuerzo que he hecho el noventa por ciento fue tuyo. Muchas gracias te lo debo todo. Te amo con todo mi ser.

A mi hermana, Marahi simplemente no soportaría una vida sin ti, te amo con todo mi corazón. No podría haber pedido una hermana mejor, que aun con nuestras peleas nunca dejamos que nos separaran. Espero que siempre estemos juntos ya que sin pelearme contigo mis días son aburridos. Gracias por todo mocosa, gracias por todo.

*Aunque el fulgor que fue tan claro en otro tiempo se quite para siempre de mi vista, aunque nada me pueda devolver esas horas de esplendor en la hierba, de gloria entre flores, no me voy a afligir, sino más bien a hallar fuerza en lo que atrás queda.*

*-William Wordsworth*

## Índice General

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	V
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>ANTECEDENTES</b> .....	6
Descripción botánica de <i>Echeveria gibbiflora</i> .....	9
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	11
<b>PREGUNTA CIENTÍFICA</b> .....	11
<b>HIPÓTESIS</b> .....	11
<b>OBJETIVOS</b> .....	12
General .....	12
Particulares .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
Obtención de la planta .....	13
Obtención de las cepas bacterianas y fúngicas .....	13
Obtención de los extractos .....	14
Determinación cualitativa de los componentes químicos de los extractos .....	14
Determinación cualitativa de las propiedades antibacterianas de los extractos .....	14
Determinación cualitativa de las propiedades antimicóticas de los extractos .....	14
Determinación cuantitativa de las propiedades antibacterianas de los extractos .....	14
Determinación cuantitativa de las propiedades antimicóticas de los extractos .....	15
Efecto de los extractos de <i>E. gibbiflora</i> sobre el crecimiento bacteriano .....	16
Actividad antioxidante .....	16
Fenoles totales .....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	18
Identificación taxonómica de la planta .....	18
Rendimiento de los extractos de <i>E. gibbiflora</i> .....	18
Identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos de <i>E. gibbiflora</i> .....	18
Actividad antimicrobiana de los extractos .....	19
Método cualitativo de la actividad antimicrobiana .....	19
Método cuantitativo de la actividad antimicrobiana .....	21
Curvas de crecimiento bacteriano .....	22
Actividad antioxidante (DPPH) del extracto metanólico y acetónico de <i>E. gibbiflora</i> .....	24
Fenoles totales .....	25
<b>DISCUSIÓN</b> .....	26

Rendimiento de los extractos y fitoquímica.....	26
Actividad antimicrobiana .....	28
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana .....	28
Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana .....	28
Curvas de crecimiento bacteriano .....	30
Evaluación de la actividad antifúngica.....	31
Actividad antioxidante y contenido fenólico .....	32
<b>CONCLUSIONES</b> .....	34
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	35
<b>ANEXOS</b> .....	42
Anexo I: Difusión en Agar o Kirby-Baüer .....	42
Anexo II: Inhibición del crecimiento radial.....	44
Anexo III. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	44
Anexo IV: Curva de letal (curva de supervivencia o efecto sobre el crecimiento). ...	46
Anexo V: Reducción del radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH) .....	47
Anexo VI: Cuantificación de los fenoles totales .....	48
Anexo VII: Mecanismos de acción de antimicrobianos.....	49

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Avistamientos de <i>E. gibbiflora</i> de 1900 a 2010 en México, registrados en Global Biodiversity Information Facility .....	10
Figura 2: Actividad antibacteriana de los extractos de <i>E. gibbiflora</i> . .....	21
Figura 3: Curva de crecimiento de <i>M. luteus</i> ATCC 10240 .....	22
Figura 4: Curva de crecimiento de la cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 .....	23
Figura 5: Comparación de la actividad antioxidante de los extractos metanólico y acetónico de <i>E. gibbiflora</i> y ác. gálico sobre el radical libre DPPH.....	24
Figura 6: Curva patrón del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales. ....	25
Figura 7: Proceso para inocular cajas Petri en la técnica de Kirby-Baüer.....	43
Figura 8: Placa de ELISA para las pruebas de microdilución.....	45
Figura 9: Proceso de dilución para la curva letal.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos del herbario de <i>E. gibbiflora</i> . .....	18
Tabla 2: Rendimiento de los extractos de <i>E. gibbiflora</i> . .....	18
Tabla 3: Pruebas colorimétricas para detectar metabolitos secundarios. ....	19
Tabla 4: Resultados promedio de los distintos tratamientos en Kirby-Baüer .....	20
Tabla 5: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB). .....	21

## RESUMEN

Las plantas presentan una serie de compuestos que las ayudan o intervienen en procesos de supervivencia. Estos compuestos denominados metabolitos secundarios (MS) los cuales presentan diversas funciones, una de ellas es la de protección contra virus, hongos o bacterias patógenas, como antioxidantes, fotoprotectores, entre otros. El hombre ha aprovechado las propiedades de los MS para su beneficio, originándose así la herbolaria. En México una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional es *Echeveria gibbiflora*, la cual es utilizada por comunidades de Puebla para tratar los malestares del herpes simple, otras comunidades situadas en Guerrero utilizan las cocciones de las hojas como un remedio contra la diarrea común, así como un remedio tópico para curar los malestares estomacales como el empacho. Estudios de laboratorio de esta especie muestran que presenta una actividad anticonceptiva en espermatozoides de humano, sin embargo no se han realizado más estudios de sus actividades biológicas, por lo que el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de *Echeveria gibbiflora*. Los extractos fueron obtenidos a partir de la parte aérea de la planta, macerando en tres solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol). A estos se les realizaron pruebas colorimétricas de presencia y ausencia de los principales grupos de MS como alcaloides, terpenos, fenoles y glucósidos. Para determinar preliminarmente la actividad antimicrobiana de los extractos se realizó un Kirby-Baüer para bacterias y levaduras, mientras que para hongos filamentosos se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial. Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) en el caso de las bacterias y levaduras se empleó microdilución en caldo, mientras que para los hongos filamentosos dilución en agar para determinar la Concentración Fungicida Mínima (CFM) y Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>). La curva de crecimiento bacteriano se realizó en 9 tiempos por un periodo total de 24 h. La determinación de la actividad antioxidante se midió mediante el método de decoloración del radical difenil-picril-hidracilo (DPPH) y la cuantificación de fenoles se obtuvo por la técnica de Folin-Ciocalteu. Los resultados de este estudio muestran que los extractos hexánico, acetónico y metanólico presentan

alcaloides, glucósidos, terpenos y fenoles, además de una actividad frente a diversas cepas bacterianas gram positivas como *S. aureus*, *S. epidermidis* y gram negativas como *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *M. luteus* ATCC 1024, presentando una CMI y CBM de 125 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el caso de *S. epidermidis* y una CMI y CBM de 125 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *M. luteus*, mientras que para las demás cepas que presentaron sensibilidad mostraron una CMI y CBM de 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En este estudio se puede observar que el extracto acetónico presenta actividad bacteriostática frente a la cepas *M. luteus* ATCC 10240 y *S. epidermidis* ATCC 12228. En cuanto a la actividad antioxidante mostrada por los diferentes extractos de *E. gibbiflora* es variada: en el caso del extracto metanólico, presentó una capacidad antioxidante media ( $\text{CA}_{50}$ ) de  $36.7 \pm 5.5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente al radical DPPH, y una concentración de  $153.26 \pm 10$  mg EAG/g de extracto, mientras que el extracto acetónico una  $\text{CA}_{50}$  de  $27.9 \pm 0.9$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una concentración de  $189.60 \pm 3.99$   $\mu\text{g}$  EAG/g de extracto. Por lo que se concluye que los extractos de *E. gibbiflora* presentan actividad antimicrobiana, sin embargo no presenta actividad antifúngica. Los extractos acetónico y metanólico tienen una actividad antioxidante efectiva frente al radical DPPH. Se observó de manera cualitativa una actividad antioxidante del extracto hexánico.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas son seres vivos expuestos a innumerables interacciones en su entorno, tanto bióticas como abióticas, de las cuales algunas de ellas pueden ser perjudiciales para ellas (Zamora *et al.*, 2004). Debido a esto necesitan mecanismos de protección para asegurar su supervivencia y reproducción (Wink, 2009). Si las plantas son infectadas por virus, bacterias u hongos biotróficos, se producen varias reacciones dependiendo del tipo de organismos que estén interaccionando (Avalos y Perez-Urria, 2009).

En una interacción planta-patógeno que sea compatible, la planta es infectada exitosamente por el patógeno, mientras que en una incompatible, el organismo es rechazado por diferentes respuestas defensivas de la misma. Esta última presenta dos tipos de comportamiento, resistencia al parasitismo específico y la no específica, de las cuales, la segunda tiene mayor importancia al significar que toda una especie muestra una resistencia a microorganismos determinados. Esta habilidad para rechazar a estos organismos se debe a un sistema de componentes y mecanismos que actúen en la defensa contra patógenos por medio de diferentes estrategias, que pueden ser constitutivas o inducidas por la infección. Los mecanismos constitutivos contra virus, bacterias y hongos incluyen la presencia de una variedad de agentes antimicrobianos preformados, como por ejemplo los metabolitos secundarios (MS) (Jürgen, 2009).

Los MS son moléculas que presentan diversas funciones (principalmente adaptativas) en los distintos procesos de las plantas, además de tener una distribución restringida en el reino vegetal, sintetizándose en pequeñas cantidades (Almaraz *et al.*, 2006). Actualmente se conocen alrededor de 100,000 compuestos derivados de las plantas. Una característica particular de ellos es que se acumulan en grandes cantidades en distintas estructuras (tronco, corteza, hojas, flor), favoreciendo la supervivencia y reproducción de la planta. Estos compuestos pueden diferir interespecíficamente e incluso intraespecíficamente. En las plantas regularmente se encuentran en una proporción en peso seco de 1.3%, almacenándose los compuestos hidrófilos en la vacuola, mientras que los compuestos lipófilos se depositan en conductos de

resina, lactíferos, tricomas o en la cutícula (Wink, 2009). Muchos de estos son de importancia terapéutica o médica debido a que presentan propiedades plaguicidas, anticarcinogénicas, antihelmínticas, antibacterianas, antivíricas o antimicóticas (Alonso, 2007).

Otra propiedad de los MS es su función como antioxidantes (Martínez-Ávila, 2013). Estos son de suma importancia dada la problemática de los radicales libres (RL) sobre la salud. Los RL son moléculas o átomos que contienen electrones no apareados en su última orbita y tienen existencia independiente (Hermes-Lima, 2004). Los RL para estabilizarse reaccionan con las moléculas a su alrededor (por ejemplo: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) provocando la generación o no de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena dañando a las células, esto puede continuar extendiéndose si los sistemas de defensa antioxidante no lo contrarrestan. Los sistemas de defensa a su vez están constituidos por un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al extracto oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este, impidiendo que las moléculas reaccionen con las especies reactivas en el medio (Venereo, 2002).

Las propiedades de los MS de las plantas han sido aprovechadas por el ser humano, el cual por medio de la observación aprendió a manipularlas, usándolas contra las enfermedades que afectaban su salud y la de los animales, dando lugar al establecimiento de lo que hoy se conoce como herbolaria (Mendoza *et al.*, 2006). En México el uso de las plantas con fines medicinales se remonta desde tiempos prehispánicos (Juárez-Rosete *et al.*, 2013).

Una de las plantas utilizadas en nuestro país en la medicina tradicional es *Echeveria gibbiflora* D.C. (Crassulaceae), conocida comúnmente como oreja de burro o lengua de vaca. En Puebla es utilizada para tratar los malestares provocados por el herpes simple (Arias *et al.*, 2000), mientras que en Guerrero utilizan cocciones de las hojas de esta planta como antidiarréico, además de un remedio tópico contra los malestares del empacho (BDMTM, 2015). Sin embargo actualmente no se han realizado estudios de la actividad antimicrobiana y antioxidante de *E. gibbiflora*.

Los estudios de las propiedades antimicrobianas son de especial importancia debido al aumento de grupos microbianos resistentes a los medicamentos (OMS, 2015). Lo cual se debe principalmente al incorrecto uso de los mismos, aunado a la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico (Silva, 2006). La resistencia bacteriana se puede dividir en dos categorías, intrínseca y adquirida. La primera se refiere a la resistencia natural de la bacteria a los distintos antimicrobianos siendo característica de una especie. La segunda hace referencia a una resistencia particular de una cepa a los agentes antimicrobianos a los cuales era sensible su especie. El segundo tipo de resistencia reside en los aspectos genéticos de las bacterias. La resistencia intrínseca es una propiedad estable codificada en el cromosoma, mientras que la adquirida implica un cambio en el DNA de la bacteria que se expresa como una nueva forma fenotípica. Este cambio se puede dar por dos razones: la primera es por mutación del genoma o la segunda, que es por adición de nuevas secuencias de DNA como son los plásmidos (Avila, 1996).

Los mecanismos de resistencia a los diferentes antimicrobianos se pueden englobar en tres grupos. El primero es la disminución de la permeabilidad, es la forma más frecuente de resistencia natural, en estos casos el medicamento no puede alcanzar el interior de la bacteria debido a la naturaleza misma de los componentes de la pared celular. En bacterias Gram positivas esta barrera no resulta eficaz contra los antibióticos, sin embargo en Gram negativas es una estructura que cambia entre especies, lo cual las ayuda en contra de la especificidad del medicamento. El segundo grupo son las modificaciones o inactivación del antibiótico, es el mecanismo más común de resistencia adquirida y está determinado en gran medida por enzimas, por ejemplo betalactamasas, las cuales inactivan los medicamentos al hidrolizar el anillo betalactámico. En el tercer grupo se encuentran las alteraciones en sitios diana. Estos mecanismos de resistencia se refieren a las modificaciones producidas en la estructura o paso metabólico sobre los que ejercen su acción, bien por incremento de la concentración de una sustancia competitiva, o por modificación de las diferentes estructuras bacterianas alternas (Cordiés *et al.*, 1998).

## ANTECEDENTES

Actualmente hay un gran interés en el campo de los productos naturales, en el cual el género *Echeveria* ha sido poco estudiado desde el punto de vista bioactivo y químico. Los trabajos reportados son los siguientes:

Martínez-Ruiz *et al.* en 2013 realizaron un estudio de las actividades biológicas y composición química que presentan los extractos de metanol, cloroformo y hexano de *E. leucotricha*, en el cual encontraron que el extracto de cloroformo presenta triterpenos, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y cianógenos pero no alcaloides, saponinas o taninos. En cuanto a la actividad antimicrobiana se observa que dos fracciones del extracto metanólico muestran actividad antibacteriana sobre la mayoría de las cepas trabajadas (dentro de las cuales están *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Por otro lado también presentaron actividad antifúngica, de los cuales mencionan que una fracción de cloroformo y una de metanol son de especial interés al inhibir a la mayoría de los organismos que trabajaron. Además de las actividades antimicrobianas, los extractos de cloroformo y metanol redujeron en un 64% y 52% respectivamente, el número de parásitos de *Leishmania donovani*. Dos de las fracciones (una de cloroformo y otra de metanol) mostraron un efecto citotóxico significativo sobre las líneas celulares THP-1. Y las distintas fracciones de *E. leucotricha* no mostraron actividad antiinflamatoria.

López-Angulo *et al.* en 2014 trabajaron con los extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* (*E. kimnachii*, *E. subrigida* y *E. craigiana*), a las cuales les realizaron pruebas de su actividad como antioxidantes y antimicrobianos así como su contenido químico. Encontrando de manera general, estas especies presentan terpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas y antocianinas además de un alto contenido en  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico. En la actividad antioxidante se observó que las tres especies de *Echeveria* trabajadas mostraban buena actividad antioxidante en los ensayos de DPPH, ORAC y ABTS. En cuanto a la actividad antimicrobiana mostrada, se aprecia que las tres especies de *Echeveria* tienen actividad frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae*. Con lo cual

concluyeron que las especies trabajadas en el estudio son una fuente importante de antioxidantes y que el extracto metanólico presenta diversas actividades biológicas como antimicrobianos, antioxidantes.

López-Angulo *et al.* en 2016 realizaron un estudio de la actividad antioxidante y anticancerígena de dos especies del género *Echeveria* (*E. kimnachii* y *E. subrigida*) además de realizar un análisis de su composición química (CG-EM), donde se observó que las diferentes fracciones metanólicas trabajadas (hexano, acetato de etilo y acuosas) presentan una gran diversidad de estructuras, siendo las fracciones de *E. kimnachii* más complejas que las fracciones *E. subrigida*. En cuanto a la actividad antioxidante observó que en ambas especies de *Echeveria* las fracciones de acetato de etilo eran las que presentaban la mayor actividad antioxidante seguida de las acuosas y hexánicas en el caso de *E. kimnachii* y de manera inversa en *E. subrigida*. En la actividad anticancerígena se puede apreciar que presentan una inhibición de la mutagenicidad en el ensayo de Ames usando *Salmonella typhimurium* YG1024, concluyendo que *E. kimnachii* y *E. subrigida* son fuentes de compuestos antimutagénicos y antioxidantes lo cual es de gran interés para la industria y farmacéutica.

En cuanto a *E. gibbiflora*, se han reportado diversos estudios de su actividad biológica como anticonceptivo; sin embargo no se han realizado estudios en cuanto a su capacidad como antimicrobiano o antioxidante:

Delgado *et al.* en 1999 estudiaron el efecto del extracto acuoso en crudo de *E. gibbiflora* encontrando un efecto espermatocida en siete diferentes especies de mamíferos, incluyendo al humano. Para ver el efecto de las fracciones purificadas del extracto acuoso utilizaron espermatozoides de cobaya, observando un comportamiento inusual en los espermatozoides, así como una distensión de la membrana plasmática sobre la región del acrosoma, induciendo la formación de una burbuja en la cabeza.

Reyes *et al.* en 2002 realizaron un estudio del efecto hipotónico de una fracción purificada del extracto acuoso en crudo de *E. gibbiflora* en espermatozoides humanos. Observaron una distensión en la membrana sobre la región del acrosoma y en algunas ocasiones en la parte media de los espermatozoides.

Se presentó una aglutinación instantánea al añadir la fracción purificada, mediante microscopia electrónica se determinó un material denso intercalado en la membrana celular, concluyendo que la fracción purificada del extracto acuoso en crudo de *E. gibbiflora* podría producir un compuesto adecuado como anticonceptivo masculino.

Reyes *et al.* en 2005 estudiaron la caracterización y el efecto de los cristales de calcio obtenidos del extracto acuoso en crudo de las hojas de *E. gibbiflora* sobre espermatozoides de toro y humano, para observar su posible papel en la eficacia anticonceptiva y el mecanismo de inmovilización por aglutinación. Los resultados indican la rápida solubilidad de los cristales de calcio, lo que muestra una presencia importante de iones calcio libre. Los bioensayos con espermatozoides humanos y de toro en presencia de diferentes concentraciones de cristales no muestran una ligera aglutinación, inmovilización, o efectos hipotónicos incluso cuando el tiempo de incubación se prolongó. Concluyendo que las moléculas de calcio no intervienen en el efecto anticonceptivo del extracto acuoso en crudo de *E. gibbiflora*.

Cordero-Martínez *et al.* en 2016 realizaron un estudio sobre las propiedades anticonceptivas del extracto acuoso en crudo de *E. gibbiflora*. El efecto se observó sobre la movilidad, viabilidad, capacitación, reacción del acrosoma, toxicidad, así como su efecto sobre el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides de ratón en condiciones de capacitación. Encontrando que la viabilidad de los espermatozoides no se ve afectada por la presencia de diferentes concentraciones del extracto, sin embargo, la capacitación y la reacción del acrosoma sufrieron una disminución significativa de una manera dependiente de la concentración, coincidiendo con la reducción de afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, *in vivo* mostraron una inhibición y motilidad progresiva en los espermatozoides de ratón junto con una disminución significativa de los parámetros cinemáticos de la motilidad y las tasas de fecundación *in vitro*. Concluyendo que es una posible fuente de compuestos anticonceptivos debido a su actividad y baja toxicidad.

### **Descripción botánica de *Echeveria gibbiflora***

El género *Echeveria* pertenece a la familia Crassulaceae, la cual se caracteriza por ser hierbas perennes o anuales, raramente arbustos, rara vez acuáticos, arborescentes, epifitas o trepadoras, con hojas de más a menos suculentas, a veces con tallos suculentos, rizomas, raíces subterráneas o cáudices suculentas. Las hojas son sésiles, rara vez pecioladas, por lo general se encuentran alternadas o en espiral, raramente verticiladas, con frecuencia agregados en rosetas. Las inflorescencias por lo general son terminales con muchas flores con verdaderos racimos o espigas. Las flores pueden ser hermafroditas, raramente unisexuales, actinomorfas o muy raramente zigomorfas. Los frutos generalmente en folículos, por lo general completamente dehiscentes a lo largo de la sutura ventral. La familia presenta una distribución mundial, por lo general en las zonas áridas y/o hábitats rocosos, con centros de diversidad en México y Sudáfrica. En cuanto a su respiración, el CO<sub>2</sub> es fijado en la noche mediante el metabolismo de ácido de las Crasuláceas (CAM), la cual es inducida bajo ciertas condiciones ambientales, especialmente en sequía (Thiede y Eggli, 2003). La familia se compone de 48 géneros con más de 1,300 *sp.* aceptadas actualmente, en el cual se encuentra el género *Echeveria* (TPL, 2016).

El género *Echeveria* se compone de plantas herbáceas perennes, a veces sufrutescentes o pequeños arbustos, suculentas, frágiles, glabras, pocas especies pubescentes; Presentan tallos simples a ramificados, solitarios o agrupados. Las hojas pueden ser aplanadas, gruesas y carnosas, dispuestas en espiral formando rosetas densas o laxas, de color verde claro a oscuro o glaucas, a veces teñidas de rojo especialmente en el margen y punta. La inflorescencia en forma de espiga, racimo, cincino o panícula, pedúnculo de color verde, amarillento o rojizo. Las flores provistas de una hoja reducida o bráctea subyacente, brácteas alternas, sésiles, la base se encuentra prolongada por debajo de su inserción con el tallo. Los sépalos (5), angostos con frecuencia desiguales, unidos en la base. La corola de color amarillo, anaranjado, rojizo, rosa, blanco o combinado. Las semillas numerosas, con frecuencia oblongas. Los géneros americanos se componen de aproximadamente 140 especies. Se distribuyen del suroeste de Texas a Centro

y Sudamérica, siendo México el país donde se concentra la mayoría de sus componentes (Pérez-Calix, 2008).

*E. gibbiflora* es un arbusto suculento con un tallo simple y grueso de 30 cm de altura, hojas de un tamaño aproximado de 15 cm de ancho y 25 cm de largo, ampliamente ovadas-orbiculares arregladas en roseta, con peciolo corto y ápice redondeado, mucronado o agudo, inflorescencia principalmente solitaria; las hojas presentan un color amarillo olivo a verde claro, más o menos glauco, teñido de gris a vino-lila; florece de Octubre a Enero; habita en zonas con sustratos rocosos, en peñascos y pendientes (Whalter, 1972). En México se distribuye en los estados de Morelos, Distrito Federal, Estado de México, Michoacán, Oaxaca, Querétaro y Coahuila (Figura 1) (GBIF, 2016).

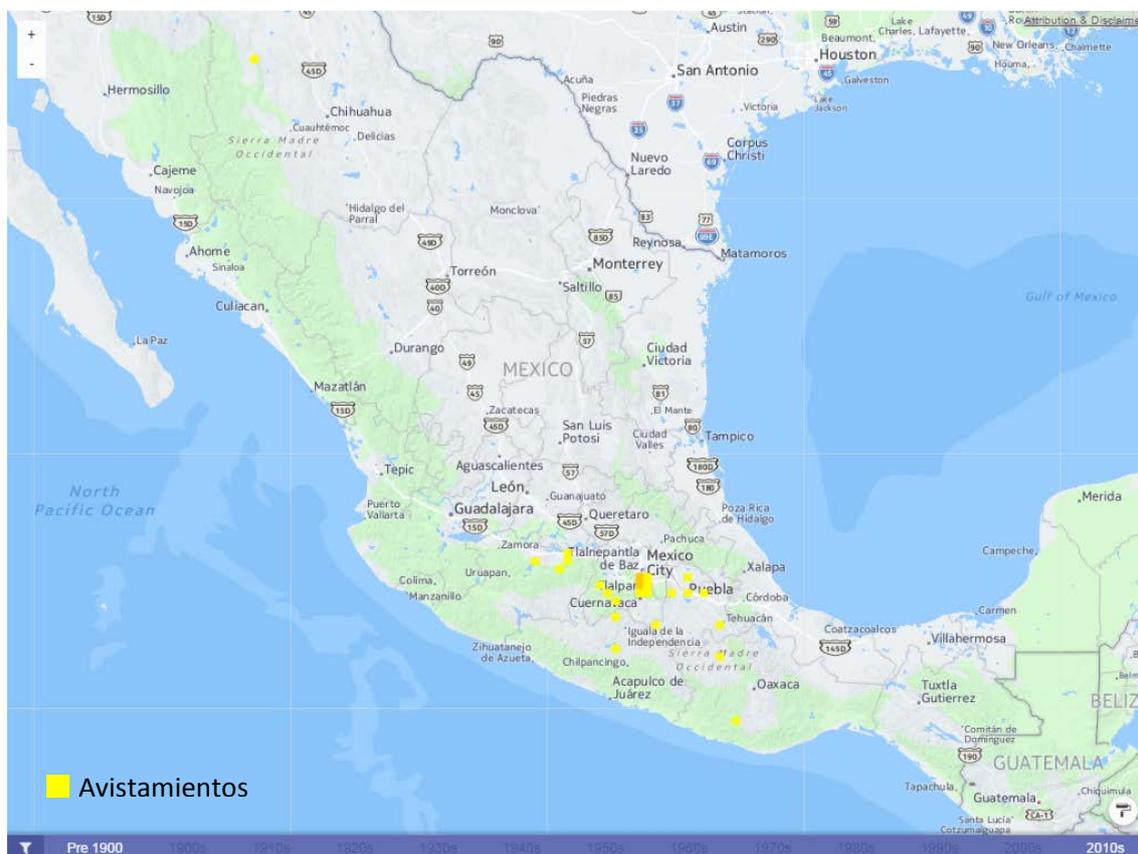


Figura 1: Avistamientos de *E. gibbiflora* de 1900 a 2010 en México, registrados en Global Biodiversity Information Facility. Tomado de: <http://www.gbif.org/species/7334611>

## JUSTIFICACIÓN

El uso inadecuado e indiscriminado de los medicamentos antimicrobianos para atender diversas enfermedades que aquejan al ser humano ha desembocado en una resistencia hacia los compuestos activos por parte de los microorganismos dada la alta presión de selección a la cual están sometidos, sumado al incremento en la exposición a radicales libres (RL) en los organismos, esto ha generado como resultado un serio déficit en la salud pública. Para solucionar esta problemática se han buscado diversas alternativas, una de ellas es la herbolaria la cual utiliza compuestos derivados de las plantas como un remedio efectivo contra diversas enfermedades y de los cuales, algunos de ellos presentan una actividad antimicrobiana y antioxidante.

## PREGUNTA CIENTÍFICA

¿*Echeveria gibbiflora* tendrá actividad antimicrobiana y antioxidante?

## HIPÓTESIS

Distintas especies del género *Echeveria* presentan una serie de compuestos como fenoles, terpenos, glucósidos, entre otros. Los cuales tienen actividad antimicrobiana y antioxidante, por lo tanto *E. gibbiflora* probablemente presentará dichas actividades biológicas.

## OBJETIVOS

### General

Evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de *Echeveria gibbiflora*.

### Particulares

- I. Obtener los extractos hexánico, acetónico y metanólico de la parte aérea de *E. gibbiflora*.
- II. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de hexano, acetona y metanol.
- III. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Bactericida Mínima (CBM), Concentración Fungicida Mínima (CFM) y Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>) de los extractos activos.
- IV. Determinar el efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento de las cepas bacterianas que presenten la menor CMI.
- V. Determinar cualitativamente la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios.
- VI. Determinar el efecto antioxidante de los extractos de *E. gibbiflora*.
- VII. Determinar el contenido de los fenoles totales de los extractos que presenten actividad antioxidante de *E. gibbiflora*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Obtención de la planta*

La planta se colectó el 05 de septiembre del 2015, a una altitud de 2296 msnm, en el Pedregal de San Ángel, Coyoacán, Ciudad de México (19° 19' 25.68" N, 99° 10' 53.62" O). Se tomó solo la parte aérea: un espécimen de esta se llevó al herbario de la FES Iztacala, a cargo de la M. en C. Edith López Villafranco, para su determinación taxonómica dejando un ejemplar en el herbario como respaldo.

### *Obtención de las cepas bacterianas y fúngicas*

Las cepas bacterianas fueron donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI, FES Iztacala (1), el laboratorio de microbiología, FES Cuautitlán (2), el hospital Ángeles Metropolitano (3), el laboratorio de fisiología vegetal, FES Iztacala (4) y el cepario del CINVESTAV-IPN (5).

Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* 23MR<sup>1</sup>, *S. aureus* ATCC 29213<sup>5</sup>, *S. aureus* cc<sup>1</sup>, *S. aureus* CUSI<sup>1</sup>, *S. aureus* FES-C<sup>2</sup>, *S. epidermidis* FES-C<sup>2</sup>, *Micrococcus luteus* ATCC 10240<sup>5</sup>.

Gram negativas: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048<sup>5</sup>, *E. gergoviae* ATCC 33028<sup>5</sup>, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506<sup>5</sup>, *Escherichia coli* 82MR<sup>1</sup>, *E. coli* CUSI<sup>1</sup>, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724<sup>5</sup>, *K. pneumoniae* ATCC 13883<sup>5</sup>, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>5</sup>, *Salmonella enterica* sub sp. serovar *Typhi* ATCC 7251<sup>5</sup>, *S. typhi* ATCC 19430<sup>5</sup>, *Serratia marcescens* ATCC 14756<sup>5</sup> y *Vibrio cholerae* ATCC 39540<sup>5</sup>.

Hongos levaduriformes: *Candida albicans* 17 MR<sup>1</sup>, *C. glabrata* cc<sup>3</sup>, *C. tropicalis* cc<sup>3</sup>.

Hongos Filamentosos: *Trichophyton metagrophytes* CDBB-H-1112, *Aspergillus niger*<sup>4</sup>, *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265, *F. sporitrichum*<sup>4</sup>

### *Obtención de los extractos*

Los extractos se obtuvieron a partir de la parte aérea de la planta, secándola a temperatura ambiente y a la sombra. Una vez seca se molieron 447.2 g de planta y se colocó en maceración en solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol). Los extractos se filtraron y se destilaron en un rotavapor a presión reducida para concentrar el extracto. El rendimiento se determinó mediante la diferencia de pesos con la siguiente fórmula.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{g de extracto obtenido}}{\text{g de planta seca utilizada}} \times 100\%$$

### *Determinación cualitativa de los componentes químicos de los extractos*

La composición química de los extractos se determinó mediante pruebas coloridas de presencia de alcaloides, fenoles, glucósidos, saponinas y terpenos, utilizando como reactivos: Dragendorff y Mayer, cloruro férrico, Molish, prueba de espuma y vainillina más ácido sulfúrico respectivamente. Utilizando 2 mg de extracto y disolviéndolo en 1 mL del solvente correspondiente para cada prueba (Domínguez, 1973).

### *Determinación cualitativa de las propiedades antibacterianas de los extractos*

La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Koneman, 2008) (Anexo I). Se impregnaron sensidiscos con 2 mg de extracto, usando como control positivo 25 µg de cloramfenicol y como control negativo 10 µL de cada uno de los solventes empleados, realizando los bioensayos por triplicado. Reportando los resultados en mm del halo de inhibición.

### *Determinación cualitativa de las propiedades antimicóticas de los extractos*

La evaluación de la actividad antimicótica para hongos miceliados se realizó mediante el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) (Anexo II). Se impregnaron sensidiscos con 2 mg de extracto, usando como control positivo 56 µg de ketoconazol y como control negativo 10 µL de cada uno de los solventes empleados, realizando los bioensayos por triplicado. Obteniendo los resultados en mm del radio de inhibición.

La evaluación de la actividad antimicótica en hongos levaduriformes se realizó mediante el método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Koneman, 2008). Utilizando como control positivo 30 µg de nistatina y como control negativo 10 µL de cada uno de los solventes empleados. Reportando los resultados en mm del halo de inhibición.

*Determinación cuantitativa de las propiedades antibacterianas de los extractos*

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se determinó por el método de dilución en caldo (Koneman, 2008) (Anexo III). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 0.031, 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 2.0 mg/mL. Realizándose cada bioensayo por triplicado. Utilizando como revelador biológico cloruro de tetrazolio (TTC). Los resultados se tomaron como positivos cuando al aplicar el TTC a los posos con bacterias estas no presentaron una coloración rojiza y negativa cuando los posos presentaron un color rojizo a violeta, propio de células vivas al metabolizar el TTC.

*Determinación cuantitativa de las propiedades antimicóticas de los extractos*

El ensayo de Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>) y Concentración Mínima Fungicida (CFM) se realizó con el método de inhibición de crecimiento radial (Wang y Bun, 2002), calculando la concentración CFM y CF<sub>50</sub> a partir de una regresión lineal. Para ello se utilizaron concentraciones de 0.031, 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 2.0 mg/mL. Realizándose cada bioensayo por triplicado y reportando los resultados en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento (CFM); mientras que la concentración que representa el 50% de inhibición corresponde a la CF<sub>50</sub>.

### *Efecto de los extractos de E. gibbiflora sobre el crecimiento bacteriano*

La determinación del efecto antimicrobiano de los extractos se determinó en una curva de crecimiento, utilizando las cepas microbianas (Gram positiva y/o Gram negativa) y hongo levaduriforme, que presenten la mayor sensibilidad en la prueba cuantitativa, realizándose de acuerdo al método propuesto por Kubo *et al.*, 1993 citado en Miguel-Espejel, 2010 (Anexo IV). La curva se realizó en 9 tiempos durante 24 h, utilizando las concentraciones de ½ CMI, CMI y CMB obtenidas anteriormente y un grupo testigo. Reportándose los resultados como el logaritmo base diez de las unidades formadoras de colonias sobre mL ( $\text{Log}_{10}$  UFC/mL).

### *Actividad antioxidante*

La actividad antioxidante se determinó por el método de decoloración del 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) a 250  $\mu\text{M}$  en metanol citado en García-Bores (Anexo V), 2010. Los extractos se utilizaron a partir de una solución Stock de 1 mg/mL en metanol, preparando concentraciones en un gradiente de 5 a 100 ppm para el extracto metanólico, mientras que para el extracto acetónico se realizó un gradiente de 5 a 60 ppm. Utilizándose como control negativo 200  $\mu\text{L}$  de metanol y como control positivo se utilizó ácido gálico de 2 a 14 ppm. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de reducción, medido por espectrometría UV-VIS a una longitud de onda de 495 nm, utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de decoloración} = \left( \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) \times 100$$

Donde:

$Abs_{control}$  = Absorbancia del control positivo

$Abs_{muestra}$  = Absorbancia de las muestra (Mezcla de DPPH + compuesto problema)

Para determinar la Capacidad Antioxidante Media ( $CA_{50}$ ) se despejo la ecuación de la curva resultante. La prueba de DPPH para la capacidad antioxidante se realizó con 4 experimentaciones independientes con una  $n=8$  por experimento.

### *Fenoles totales*

Los fenoles totales se cuantificaron mediante el método Folin-Ciocalteu según lo descrito por Singleton y Rossi (1965) (Anexo VI), el cual se basa en una reacción de óxido-reducción, midiéndolo a una absorbancia de 765 nm. Se genera una curva patrón con ácido gálico de 10 a 80 µg/mL. Los extractos metanólico y acetónico se emplearon a una concentración de 1 mg/mL. Expresando los resultados como miligramos equivalentes de ác. gálico por gramo de extracto (mg EAG/g). La cuantificación de los fenoles totales de los extractos de *E. gibbiflora* se realizó con tres experimentos independientes con una n=3 por experimento.

## RESULTADOS

### *Identificación taxonómica de la planta*

El material vegetal fue identificado como *Echeveria gibbiflora* DC. con el número de registro 2492IZTA (Tabla 1).

Tabla 1: Datos del herbario de *E. gibbiflora*.

<b>Nombre Científico</b>	<i>Echeveria gibbiflora</i>	<b>Especie</b>	<i>E. gibbiflora</i>
<b>Familia</b>	Crassulaceae	<b>Fecha de colecta</b>	05-sep-2016
<b>Orden</b>	Saxifragales	<b>No. de Registro</b>	<b>2492IZTA</b>
<b>Género</b>	<i>Echeveria</i>		

### *Rendimiento de los extractos de E. gibbiflora*

La maceración se realizó a partir de 447.2 g de la parte aérea de la planta seca. El extracto metanólico de *E. gibbiflora* fue el que presentó el mayor rendimiento (17.5%), seguido del extracto acetónico (1.8%), mientras que el extracto hexánico fue el que presentó el menor rendimiento (1%) (Tabla 2). Lo que indica una concentración mayor de MS polares.

Tabla 2: Rendimiento de los extractos de *E. gibbiflora*.

Extracto	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	4.6	1.0
Acetónico	7.9	1.8
Metanólico	78	17.5

### *Identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos de E. gibbiflora*

Los extractos obtenidos a partir de la maceración con hexano presentaron una reacción positiva para alcaloides, glucósidos y terpenos, sin embargo no se encontraron fenoles ni saponinas. Mientras que en el extracto acetónico además de los MS antes mencionados también se encontraron fenoles. Por último, el extracto metanólico, mostró una reacción positiva para glucósidos, terpenos y fenoles, cabe mencionar que en estas pruebas las reacciones para detectar fenoles y terpenos fueron muy coloridas (Tabla 3). Lo que podría

significar un alto contenido de estos MS en los extractos acetónicos y metanólicos.

Tabla 3: Pruebas colorimétricas para detectar metabolitos secundarios.

Grupo	Hexánico	Acetónico	Metanólico
Alcaloides (Dragendorff / Mayer)	+/+	+/+	- /-
Glucósidos	+	+	+
Terpenos	+	+	+
Fenoles	-	+	+
Saponinas	-	-	-

(+) presencia y (-) ausencia del metabolito

### *Actividad antimicrobiana de los extractos*

#### *Método cualitativo de la actividad antimicrobiana*

Los resultados obtenidos muestran que la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a los diferentes extractos de *E. gibbiflora* es variable (Tabla 4). El extracto acetónico presentó la mayor actividad inhibiendo 3 de las 20 cepas bacterianas, siendo *S. epidermidis* ATCC 12228 la que mostró un mayor halo de inhibición ( $8.6 \pm 0.6$  mm), seguida de *M. luteus* ( $7.7 \pm 0.6$  mm) y luego *S. aureus* FES-C ( $7.0 \pm 0.0$  mm). El extracto hexánico inhibió 2 cepas, *S. aureus* cc que exhibió el mayor halo de inhibición ( $10.3 \pm 0.6$  mm) y *S. aureus* ATCC 29213 ( $8.7 \pm 0.6$  mm), mientras que el extracto metanólico fue el que presentó la menor actividad, teniendo efecto únicamente frente a *K. pneumoniae* ATCC 13883 ( $6.0 \pm 0.0$  mm) y *S. aureus* FES-C ( $5.6 \pm 0.6$  mm) el cual mostró el menor halo de inhibición (Figura 2). El control positivo tuvo efecto en todas las cepas con un promedio de  $19.23 \pm 1.1$  mm siendo significativamente mayor con respecto a los extractos analizados ( $p < 0.05$ ). Se observa que los extractos de *E. gibbiflora* presentan un espectro reducido. Siendo sensibles las bacterias Gram positivas.

Los extractos de *E. gibbiflora* no tuvieron efecto contra los hongos levaduriformes y filamentosos.

Tabla 4: Resultados promedio de los distintos tratamientos en la prueba Kirby-Baüer.

Bacterias	Hexano (mm)	Acetona (mm)	Metanol (mm)	Cloramfenicol (mm)
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 <sup>5</sup>	-	-	-	21
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028 <sup>5</sup>	-	-	-	17
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 14506 <sup>5</sup>	-	-	-	17
<i>Escherichia coli</i> 82 MR <sup>1</sup>	-	-	-	18
<i>Escherichia coli</i> Cusi <sup>1</sup>	-	-	-	13
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724 <sup>5</sup>	-	-	-	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <sup>5</sup>	-	-	6	17
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240a <sup>5</sup>	-	7,7	-	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <sup>5</sup>	-	-	-	18
<i>Salmonella enterica</i> sub sp. <i>Enterica</i> serovar <i>typhi</i> ATCC 7251 <sup>5</sup>	-	-	-	19
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 <sup>5</sup>	-	-	-	20
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756 <sup>5</sup>	-	-	-	11
<i>Staphylococcus aureus</i> 23 MR <sup>1</sup>	-	-	-	20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 <sup>5</sup>	8,7	-	-	17
<i>Staphylococcus aureus</i> cc <sup>1</sup>	10,3	-	-	19
<i>Staphylococcus aureus</i> Cusi <sup>1</sup>	-	-	-	21
<i>Staphylococcus aureus</i> FES-C <sup>2</sup>	-	7	6	21
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 <sup>5</sup>	-	8,6	-	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FES-C <sup>2</sup>	-	-	-	19
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 39540 <sup>5</sup>	-	-	-	25
Hongos levaduriformes				Nistatina
<i>Candida albicans</i> 17MR <sup>1</sup>	-	-	-	13
<i>Candida glabrata</i> <sup>3</sup>	-	-	-	15
<i>Candida tropicalis</i> <sup>3</sup>	-	-	-	14
Hongos miceliados				Ketoconazol
<i>Trichophyton metagrophytes</i> CDBB-H-1112	-	-	-	8
<i>Aspergillus niger</i> <sup>4</sup>	-	-	-	10
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265	-	-	-	10
<i>Fusarium sporitrichum</i> <sup>4</sup>	-	-	-	7

<sup>1</sup>Donada por el Laboratorio de Análisis clínicos de la CUSI, FES Iztacala; <sup>2</sup>Donada por el Laboratorio de Microbiología, FES-Cuautitlán; <sup>3</sup>Aislada de un caso clínico y donada por el Hospital Ángeles (Metropolitano); <sup>4</sup>Donada por el laboratorio de Fisiología Vegetal, FES Iztacala; <sup>5</sup> Obtenidas del cepario del CINVESTAV-IPN

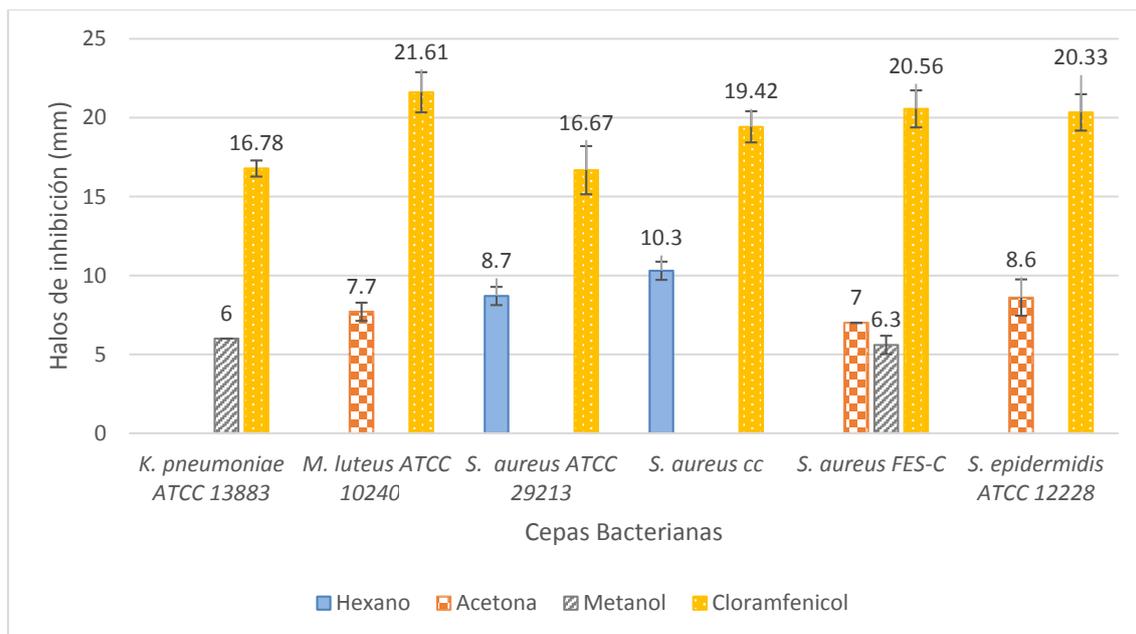


Figura 2: Actividad antibacteriana de los extractos de *E. gibbiflora*.

#### Método cuantitativo de la actividad antimicrobiana

Las pruebas cuantitativas de la actividad antimicrobiana muestran que el extracto de acetona de *E. gibbiflora* presentó un mayor efecto inhibitorio sobre *M. luteus* ATCC 10240 y *S. epidermidis* ATCC 12228 presentando una CMI de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una CBM de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ambas cepas bacterianas. El resto de las cepas fueron sensibles a los extractos con una CMI de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una CMB de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 4).

Tabla 5: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).

T. bacteriano	Extracto	Bacteria	CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CMB ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Gram negativas	Metanol	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	500	1000
	Hexano	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	500	1000
	Hexano	<i>S. aureus</i> cc	500	1000
Gram positivas	Metanol	<i>S. aureus</i> FES-C	500	1000
	Acetona	<i>S. aureus</i> FES-C	500	1000
	Acetona	<i>M. luteus</i> ATCC 10240	125	250
	Acetona	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	125	250

### Curvas de crecimiento bacteriano

El efecto del extracto acetónico de *E. gibbiflora* sobre la curva de crecimiento de la cepa bacteriana *M. luteus* ATCC 10240 (Gram positiva) (Figura 3) muestra que el grupo testigo presentó un crecimiento exponencial transcurridas dos horas desde el inicio del experimento empezando en 3.85 hasta 8.14 log<sub>10</sub> UFC/mL después de 24 h. el cuál es el comportamiento normal de la cepa bacteriana. La ½ CMI tuvo un efecto durante las primeras 3 h manteniendo la población de 3.89 a 4.05 log<sub>10</sub> UFC/mL, observándose que el efecto del extracto se perdió pasadas las 3 h y llegando a 8.13 log<sub>10</sub> UFC/mL a las 24 h. La CMI mantuvo la población de 3.86 a 3.99 log<sub>10</sub> UFC/mL durante 6 h, perdiendo el efecto pasado este tiempo, llegando a 7.90 log<sub>10</sub> UFC/mL transcurridas 24 h. Por otro lado la CBM presentó un descenso de 3.80 a 2.63 log<sub>10</sub> UFC/mL en un periodo de 12 h, después de haber transcurrido 12 h la bacteria empieza a crecer nuevamente hasta alcanzar 4.07 log<sub>10</sub> UFC/mL a las 24 h. Por lo que se sugiere que el extracto acetónico de *E. gibbiflora* presenta actividad bacteriostática sobre *M. luteus* ATCC 10240.

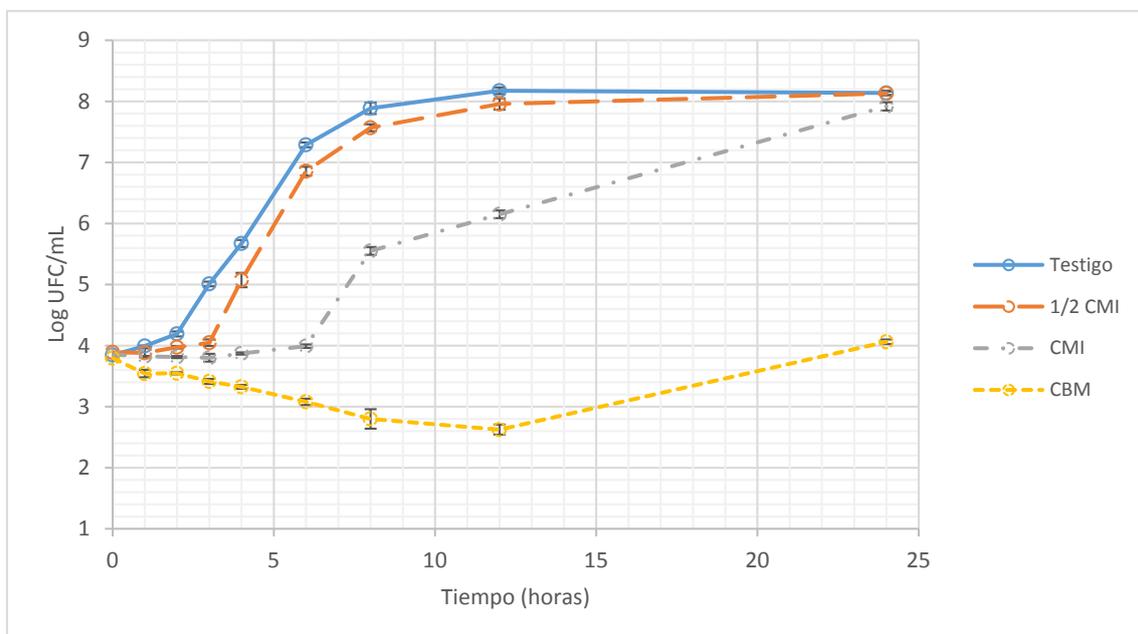


Figura 3: Curva de crecimiento de *M. luteus* ATCC 10240 durante 24 hrs. (9 tiempos) expuesta al extracto acetónico de *E. gibbiflora* a las diferentes concentraciones.

Mientras que el efecto del extracto acetónico de *E. gibbiflora* sobre el crecimiento de la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 (Gram positiva) (Figura 4) muestra que el testigo tuvo un crecimiento exponencial de 2.94 log<sub>10</sub> UFC/mL a 8.38 log<sub>10</sub> UFC/mL transcurridas 24 h. el cuál es el comportamiento normal de la cepa bacteriana. La ½ CMI tuvo un efecto bacteriostático durante 3 h manteniendo la población de 2.99 a 3.01 log<sub>10</sub> UFC/mL, llegando a 8.36 log<sub>10</sub> UFC/mL transcurridas 24 h. La CMI mostró efecto durante 4 h manteniendo la población en un rango de 2.89 a 3.04 log<sub>10</sub> UFC/mL, llegando a 6.86 log<sub>10</sub> UFC/mL transcurrido 24 h. Finalmente la CBM presenta actividad durante 8 h, manteniendo la población en un rango de 2.85 a 2.95 log<sub>10</sub> UFC/mL, llegando a 5.76 log<sub>10</sub> UFC/mL pasadas 24 h. Lo que nos muestra que el extracto acetónico de *E. gibbiflora* también tiene actividad bacteriostática sobre *S. epidermidis* ATCC 12228.

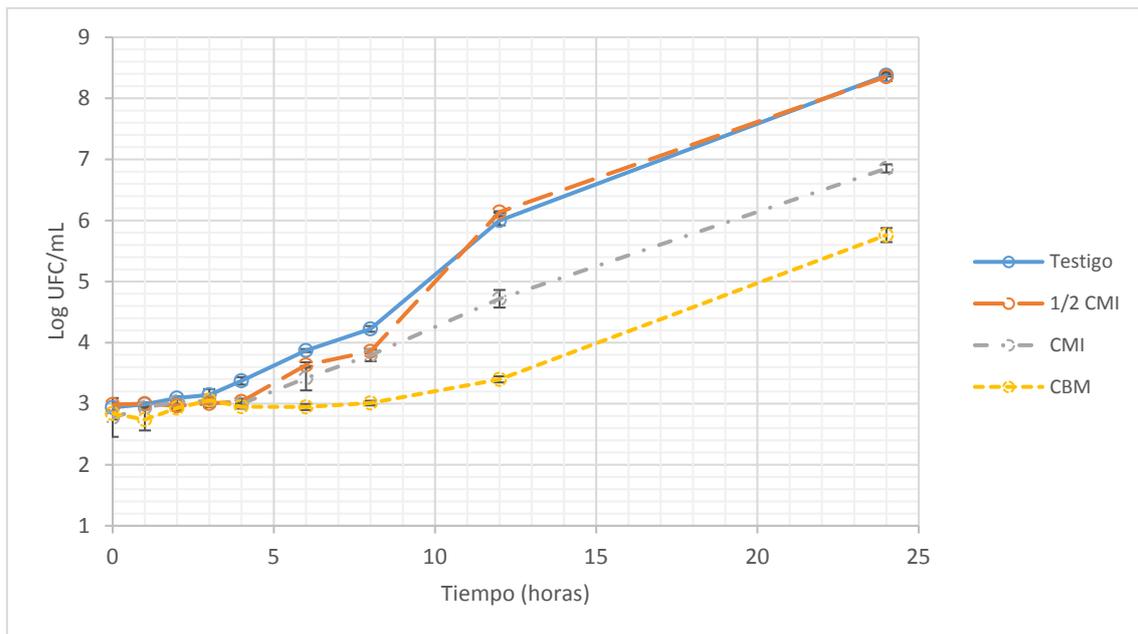


Figura 4: Curva de crecimiento de la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 durante 24 hrs. (9 tiempos) expuesta al extracto acetónico de *E. gibbiflora* a las diferentes concentraciones.

### Actividad antioxidante (DPPH) del extracto metanólico y acetónico de *E. gibbiflora*

El extracto metanólico de *E. gibbiflora* presentó una buena capacidad antioxidante frente al radical DPPH obteniendo una  $CA_{50}$  de  $36.7 \pm 5.5 \mu\text{g/mL}$ . Sin embargo el extracto acetónico tuvo una mayor capacidad antioxidante con una  $CA_{50}$  promedio de  $27.9 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ . Pero estos extractos presentaron una  $CA_{50}$  mayor que la del ácido gálico ( $3.5 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ ) (Figura 5) mostrando diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Así el ácido gálico el que presentó una mayor actividad antioxidante, seguida del extracto acetónico y por último el metanólico (ácido gálico < acetona < metanol). Cabe señalar que el extracto hexánico también presentó actividad antioxidante, aunque solo se observó de manera cualitativa.

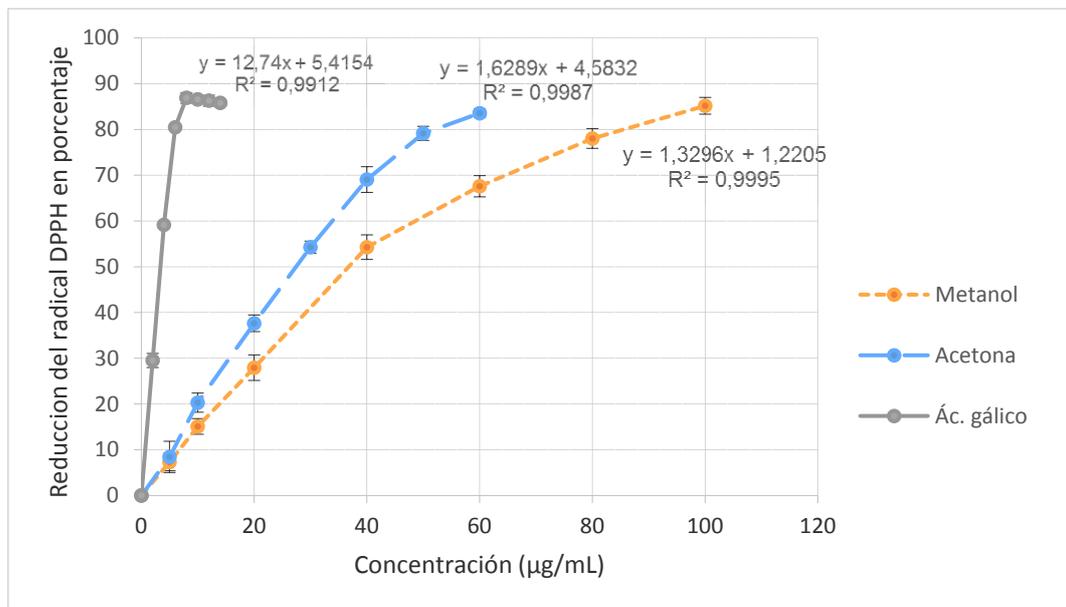


Figura 5: Comparación de la actividad antioxidante de los extractos metanólico y acetónico de *E. gibbiflora* y ácido gálico sobre el radical libre DPPH.

### Fenoles totales

Los resultados de la cuantificación de fenoles muestran que el extracto metanólico de *E. gibbiflora* presenta  $153.26 \pm 10$  mg EAG/g de extracto, mientras que el extracto acetónico  $189.60 \pm 3.99$  mg EAG/g de extracto (Figura 6), los cuales presentan una diferencia significativa entre extractos ( $p < 0.05$ ).

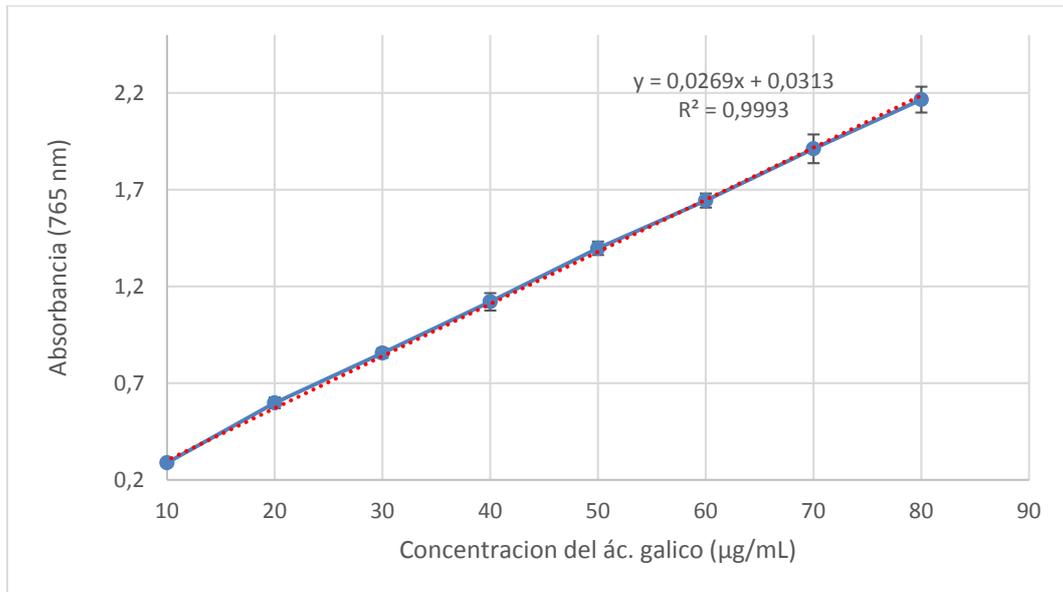


Figura 6: Curva patrón del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

## DISCUSIÓN

### *Rendimiento de los extractos y fitoquímica*

Los datos de rendimiento de los distintos extractos de *E. gibbiflora* sugieren que los compuestos de mayor polaridad son los más abundantes (metanólico 17.5%) mientras que los no polares son los menos abundantes (hexánico 1%). Los resultados en cuanto al rendimiento obtenido en el extracto metanólico concuerda con lo reportado por López-Angulo *et al.* (2014), ellos observaron un rendimiento del extracto metanólico de *E. kimnachii* de 40.3% seguida de *E. cragiana* con 32.3%, y *E. subrigida* con 20.7%, lo que muestra que la planta de este estudio (*E. gibbiflora* con un 17.5%) presenta el menor rendimiento de las cuatro especies. Este porcentaje en el rendimiento del extracto metanólico, se puede deber a la estrategia de almacenamiento de agua de las Crasulaceas, estas plantas presentan un engrosamiento en raíz, tallos y hojas para permitir una mayor acumulación de agua, permitiéndoles sobrevivir en entornos áridos o con lluvias poco frecuentes (Gonzales, 2012). Esto permite almacenar más compuestos polares, ya que como sabemos estos compuestos se acopian en las vacuolas celulares, lugar donde se acumula el agua en las células. Cruz (1990), menciona que el contenido de agua de *E. gibbiflora* en época de sequía es del 95% y en época de lluvias alcanza el 99%.

Las pruebas fitoquímicas de detección de MS muestran que el extracto acetónico de *E. gibbiflora* presenta la mayor diversidad de metabolitos, seguida del extracto hexánico y metanólico (Tabla 3). Estos resultados se asemejan a los reportados por Cruz (1990) en donde se observa que el extracto metanólico de la misma especie presenta diversos fenoles, glucósidos y terpenos; pero no encontraron alcaloides, sin embargo en este estudio se encontró a este grupo de MS en los extractos de menor polaridad (hexánicos y acetónicos). Otros estudios realizados por López-Angulo *et al.* (2014) muestran que dos especies de *Echeveria* trabajadas por ellos presentan saponinas y no contienen alcaloides en comparación con *E. gibbiflora*, sin embargo los alcaloides se observaron en los extractos acetónicos y hexánicos, los cuales no fueron estudiados en las otras especies trabajadas por López-Angulo y colaboradores.

Los alcaloides presentes en *E. gibbiflora* son de gran importancia ya que nos sugiere una posible depredación o competencia hacia esta planta. Actualmente se sabe que los alcaloides tienen su función en la ecología como mediadores entre bacterias simbióticas y sus hospederos, sirven como señal para los insectos polinizadores, además de proporcionarle protección contra organismos nocivos como herbívoros, insectos y microorganismos. También pueden realizar algunas funciones fisiológicas tales como almacenamiento y transporte de nitrógeno, además de protección a la luz ultra violeta (Goyal, 2013). Thiede y Egli (2003) mencionan que se han encontrado proantocianidinas (taninos condensados) en todos los clados dentro de Crassulaceae, excepto en el clado Acre donde están ausentes o por lo menos pocas especies los presentan, siendo estos reemplazados por alcaloides. Estando restringidos a este clado y ausentes es sus miembros más lejanos, exceptuando al género *Echeveria*. Por lo tanto esta relación filogenética explica la presencia de alcaloides en *E. gibbiflora*.

En cuanto a porque encontramos compuestos polares como los glucósidos en el extracto hexánico, se podría deber a que muchos compuestos no polares se unen a azúcares para almacenarse y posteriormente ser utilizados por las plantas como forma de defensa contra la herbívora. Los glucósidos son moléculas resultantes de la condensación de glúcidos y otros compuestos de diferente naturaleza química como por ejemplo esteroides, fenoles, taninos, entre otros (Alfonso, 2003). Cuando se sintetizan, el azúcar se une mediante su carbono anomérico reductor a un grupo alcohol propio o de otro compuesto que puede o no ser un azúcar. Estos glúcidos presentan diversas propiedades como alta solubilidad y una gran capacidad de hidratación (higroscopicidad) (Badui, 2006). Por lo que estos compuestos podrían ayudar a *E. gibbiflora* a almacenar grandes cantidades de agua, ayudando así, como se mencionó anteriormente, a que la planta sobreviva en los ambientes áridos con poca lluvia.

Las diferencias en el rendimiento y composición química pueden ser explicadas por la biología de los organismos en cuestión, los MS se distribuyen de diferente forma en las plantas, esto depende de la función que desempeña cada compuesto y las necesidades ambientales de las plantas dadas las

interacciones con esta (Sepúlveda *et al.* 2003). Además se sabe que los MS pueden ser distintos entre especies incluso dentro de una misma especie (Wink, 2009). De tal forma que las condiciones ambientales a las cuales están expuestas las plantas del estudio de López-Angulo *et al.* (2014) son drásticamente distintas a las de este estudio, ya que el material trabajado (hojas) por López-Angulo fue recolectado en Sinaloa cuyo clima de manera general es cálido a seco, mientras que la zona de colecta de este trabajo presenta un clima templado a templado sub-húmedo con lluvias en verano (INEGI, 2016).

### *Actividad antimicrobiana*

#### *Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana*

Las tres cepas de *S. aureus* fueron las que presentaron mayor sensibilidad hacia los extractos lo cual es comparable con lo reportado por López-Angulo *et al.* (2014), donde los extractos metanólicos de tres especies de *Echeveria* presentaron un efecto antibacteriano contra esta bacteria Gram positiva. Sin embargo en el presente estudio, los extractos que tuvieron una mayor eficacia fueron los hexánicos y acetónicos. Los resultados de este estudio también concuerdan con lo reportado por Martínez-Ruiz *et al.* (2013), donde observaron que el extracto metanólico de *E. leucotricha* tuvo efecto contra *K. pneumoniae* y *S. aureus*. López-Angulo *et al.* (2014) menciona que usualmente las bacterias Gram positivas son más sensibles a los distintos antimicrobianos que las Gram negativas debido a la complejidad en cuanto a la pared y membrana celular de las bacterias.

#### *Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana*

Los resultados de las pruebas cuantitativas de la actividad bacteriana muestran que el extracto acetónico fue el que tuvo las menores CMI (125 µg/mL). Esto difiere con lo reportando por López-Angulo *et al.* (2014) donde menciona que el extracto metanólico de *E. subrigida* muestra una CMI de 15.63 y 62.5 µg/mL frente a cepas diferentes de *S. aureus* (*S. aureus* 3 y *S. aureus* ATCC 29213, respectivamente), mientras que las otras dos especies *E. craigiana* y *E. kimnachii* muestran efecto sobre *S. aureus* a concentraciones similares a la de este estudio. Martínez-Ruiz *et al.* (2013) reporta que las diferentes fracciones

de *E. leucotricha* tienen una CMI de 20 µg/mL sobre *S. aureus*. Esto podría deberse a que en el extracto metanólico se encuentra algún compuesto con una alta actividad antibacteriana la cual no está presente en *E. gibbiflora*.

El efecto antibacteriano que presentan los extractos de *E. gibbiflora* puede deberse a la presencia de distintos compuestos como los terpenos, alcaloides o fenoles, los cuales se tiene reportado que presentan actividad antimicrobiana. Los terpenos son MS originados a partir de la fusión de unidades con 5 carbonos denominados isoprenos. Los cuales al tener una naturaleza lipófila pueden interaccionar con las membranas de las bacterias, lo cual se traduce en un aumento de la fluidez, permeabilidad, expansión, además de una perturbación de las proteínas incorporadas en la membrana, inhibición de la respiración y la alteración de los procesos de transporte de iones (Trombetta *et al.*, 2005).

En cuanto a la actividad antibacteriana de los alcaloides, está dada por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos.

Por su parte los fenoles son moléculas caracterizadas por presentar un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, estas moléculas por lo general presentan fitotoxicidad por lo que son almacenadas en las vacuolas celulares en su forma glucosilada, se ha observado que estos metabolitos ayudan a las plantas a limitar el crecimiento de las infecciones (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Actualmente se han determinado distintos mecanismos de acción antibacterianos y sus blancos específicos, clasificándose de acuerdo al nivel celular en donde actúan, formando seis grandes grupos. Los primeros son los inhibidores de la pared celular, los cuales actúan en tres etapas: en la síntesis, transporte y transpeptidación. Los segundos son los bloqueadores de los mecanismos de resistencia. El tercer grupo se centra en la actividad sobre las membranas celulares. En el cuarto grupo se encuentran los inhibidores de la síntesis proteica, la cual es considerada como selectiva gracias a las diferencias morfológicas entre ribosomas procariontes y eucariotes. La mayoría de los antibióticos de este grupo suelen ser bacteriostáticos, aunque esta es dependiente de la concentración y la afinidad con la diana, actuando en las

diferentes fases de la síntesis proteica. En cuanto al quinto grupo, se caracterizan por presentar actividad en el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos. Y el sexto grupo bloquea la síntesis de factores metabólicos (Anexo VII) (Calvo y Martínez–Martínez, 2009; Cordiés *et al.*, 1998).

La actividad antibacteriana presente es de gran importancia, ya que las cepas bacterianas las cuales fueron sensibles son de relevancia médica. Además de que se observa una posible actividad bacteriana específica sobre blancos gram positivos lo cual nos habla de un espectro reducido. Esto es importante ya que con excepción de la pared celular, el resto de los blancos antimicrobianos también se encuentran en células eucariotas, por lo cual la afinidad de los antimicrobianos de interés clínico es por sustancias que actúen solo en sitios diana procariontas disminuyendo así el riesgo de los efectos adversos (Calvo y Martínez–Martínez, 2009).

#### *Curvas de crecimiento bacteriano*

Las curvas de crecimiento bacteriano muestran que el extracto acetónico de *E. gibbiflora* presento un efecto bacteriostático sobre las cepas *M. luteus* ATCC 10240 y *S. epidermidis* ATCC 12228. También se observó una disminución de la población de la cepa *M. luteus* ATCC 10240 la cual no se presentó en la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, esto se debe posiblemente a las diferencias morfológicas, fisiológicas, metabólicas o genéticas que presentan entre estas dos especies, haciendo a una más sensible que a la otra. Cordiés *et al.* (1998), menciona que uno de los mecanismos de resistencia natural en bacterias es la disminución de la permeabilidad de la pared celular, la cual está determinada por su composición, siendo en bacterias Gram positivas, usualmente, una barrera que no impide la penetración de los antibióticos; sin embargo, en las Gram negativas, representa una barrera difícil de vencer y que varía según las diferentes especies (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Otro aspecto importante del efecto bacteriostático de espectro reducido del extracto acetónico de *E. gibbiflora* podría observarse en el fenómeno de colonización cruzada y en el sistema inmune. Cuando se administra un medicamento a un paciente para el tratamiento de una enfermedad el antibiótico actúa sobre el germen responsable de esa infección y a la vez sobre

las otras bacterias de la flora normal. El efecto sobre esta se traduce en la selección de cepas resistentes que pueden ser dispersadas, este fenómeno ha llevado a que los agentes bacterianos productores de infecciones adquiridas se caractericen entre otras cosas por presentar resistencia a más de un antibiótico (Quintana, 2002), así que, al utilizar un antibiótico que sea selectivo y bacteriostático, no solo permitiría que el organismo genere sus propias defensas, si no, además se reduciría el efecto de resistencia bacteriana al limitarse únicamente a las bacterias causantes de la infección.

El efecto bacteriostático del extracto acetónico de *E. gibbiflora* sobre estas dos especies bacterianas es de gran interés dada su importancia al causar enfermedades al ser humano. Los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* son bacterias Gram positivas que están presentes de forma natural en el ser humano junto a otras especies (*Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Dermabacter*, *Acinetobacter*, entre otras), formando la microbiota de la piel y mucosas de los humanos. Estos organismos se han vuelto cada vez más importantes en los últimos años debido a que han estado implicados en infecciones de tejidos que rodean material protésico, lo que puede conducir a infecciones sistémicas, endocarditis, entre otras enfermedades, especialmente en poblaciones de pacientes inmunodeprimidos (Miltiadous y Elisaf, 2011; Wilson, 2008; Smith *et al.*, 1999; Karchmer *et al.*, 1983).

#### *Evaluación de la actividad antifúngica*

En este ensayo los extractos de *E. gibbiflora* fueron puestos a prueba contra 4 cepas de hongos filamentosos y 3 levaduriformes; sin embargo ninguno de los tres extractos analizados tuvo efecto contra estos microorganismos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Martínez-Ruiz *et al.* (2013), el cual menciona que los extractos metanólicos de *E. leucotricha* eran poco efectivos contra hongos filamentosos y levaduriformes, siendo una fracción metanólica (MF1) la que presentó actividad frente a los distintos hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*).

Los hongos filamentosos son de los microorganismos más estudiados debido a su importancia médica, en especial las micosis profundas, existiendo un importante incremento de nuevas enfermedades micóticas debido, entre otras

cosas, al uso de fármacos cada vez más potentes, que predisponen a estos organismos a una presión evolutiva (Bonifaz, 2012), por lo que se han buscado nuevas fuentes de compuestos con actividad antifúngica, pero a pesar de todos los estudios siguen siendo uno de los factores de mortalidad humana.

#### *Actividad antioxidante y contenido fenólico*

Todos los extractos de *E. gibbiflora* mostraron actividad antioxidante (Figura 5), de manera general dicha capacidad fue buena ( $200 > CA_{50}$ ), ya que de acuerdo con lo reportado por la FDA (Food and Drug Administration, USA), los antioxidantes aprobados son los que presenten una concentración menor a 200 ppm (Gardziella *et al.*, 2000).

El extracto que presentó la menor  $CA_{50}$  fue el acetónico ( $27.9 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ ) seguido del metanólico ( $36.7 \pm 5.5 \mu\text{g/mL}$ ), esto posiblemente se deba a que en el extracto acetónico se encuentren compuestos antioxidantes en mayor concentración. Esto es corroborado con los análisis de fenoles totales, donde se observó que el extracto acetónico de *E. gibbiflora* fue el que presentó una mayor concentración de fenoles (189.60 mg EAG/g de extracto) lo cual confirma los resultados de la prueba de DPPH donde presentó una mayor capacidad antioxidante ( $CA_{50}$  de  $27.9 \mu\text{g/mL}$ ) contrario del extracto metanólico ( $CA_{50}$  de  $36.7 \mu\text{g/mL}$  y 153.26 mg EAG/g) donde se presenta una menor concentración de fenoles. Por lo cual la actividad antioxidante de los extractos acetónico y metanólico de *E. gibbiflora* se puede atribuir al contenido de compuestos fenólicos presentes.

López-Angulo *et al.* (2014) reporta que las concentraciones de fenoles en el caso de *E. subrigida* son de 302.8 mg EAG/g de extracto, mientras que *E. kimnachii* y *E. craigiana* presentaron una concentración de 108.8 mg EAG/g de extracto y 102.1 mg EAG/g de extracto respectivamente, los cuales se asemejan a las concentraciones presentadas por *E. gibbiflora*.

Sin embargo en los resultados de López-Angulo *et al.* (2014) se observa que *E. kimnachii* presenta una concentración más baja de fenoles ( $108.8 \pm 8.7 \text{ mg EAG/g}$ ) con respecto a *E. subrigida* ( $302.8 \pm 7.3 \text{ mg EAG/g}$ ) mostrando esta última una  $CA_{50}$  menor frente al radical DPPH, lo que sugiere que no solo son

los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante alta, sino otros compuestos como los  $\beta$ -carotenos, ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferoles los cuales estuvieron presentes en las tres especies de *Echeveria* estudiadas.

Este fenómeno se puede observar en el extracto hexánico de *E. gibbiflora* ya que aunque no presento fenoles sí presentó actividad antioxidante de forma cualitativa. En el caso de este estudio no se realizaron pruebas para la identificación de compuestos antioxidantes de menor polaridad como los anteriormente mencionados, sin embargo de manera visual se puede observar en las hojas de *E. gibbiflora* tonalidades que van desde amarillentas, rojizas a violáceas principalmente en el ápice de las hojas, estos colores son característicos de organismos que presentan carotenoides. Las plantas terrestres, incluyendo musgos y helechos, presentan en mayor proporción  $\beta$ -caroteno, violaxantina, neoxantina y luteína en los cloroplastos para la fotosíntesis (Takaichi, 2013).

Los compuestos fenólicos han sido de gran interés debido a la amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas que presentan especialmente su actividad antiinflamatoria, antioxidante, actividades antimutagénicas y anticancerígenas. Estos MS son producto de la interacción de la planta con el ambiente especialmente durante el crecimiento o en respuesta a las condiciones tales como infecciones, heridas o radiación UV (Goleniowski *et al.*, 2013).

Los fenoles son utilizados por las plantas en condiciones áridas, dada la alta incidencia solar y déficit hídrico a la cual están expuestas aunado a otros factores climatológicos los cuales ocasionan que las plantas entren en un estado de estrés, esto a su vez provoca un incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) desembocando en un estrés oxidativo, debido a esto necesitan mecanismos de protección (antioxidantes) para contrarrestar el estrés oxidativo (García *et al.*, 2011). Así mismo también son necesarios en los procesos de defensa contra microorganismos patógenos, ya que en la respuesta hipersensitiva de las plantas incluye, además de otros posesos, la liberación de altas concentraciones de ERO (Levine *et al.*, 1995).

## CONCLUSIONES

- Los extractos de *E. gibbiflora* presentaron actividad antibacteriana y antioxidante.
- Los extractos de hexano, acetona y metanol de *E. gibbiflora* tuvieron efecto antibacteriano.
- El extracto acetónico de *E. gibbiflora* tuvo efecto bacteriostático en *M. luteus* ATCC 10240 y *S. epidermidis* ATCC 12228 con una CBM de 250  $\mu\text{g/mL}$ .
- El extracto acetónico de *E. gibbiflora* presentó la menor  $\text{CA}_{50}$  (27.9  $\mu\text{g/mL}$ ) y una mayor concentración de fenoles (189.60 mg EAG/g de extracto).
- Con el presente estudio se corrobora el uso etnobotánico de *E. gibbiflora* como antimicrobiano.
- Se detectó actividad antioxidante en *E. gibbiflora*, lo cual la hace valiosa en el área de la medicina.

## LITERATURA CITADA

- Alfonso, R. G. 2003. Productos naturales. En: Alfonso, R. G. Remington farmacia. 20ª edición. Editorial Médica Panamericana. 470-507 pp.
- Almaraz, A. N.; Avila, R. J. A.; Delgado, A. E. A.; Naranjo, J. N. y Herrera, C. J. 2006. El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. *Revista Vidsupra* 1 (2): 39-50.
- Alonso, J. 2007. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. *Corpus*. Argentina. 310-313 pp.
- Arias, T. A. A.; Valverde, V. M. T. y Reyes, S. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. México. 80 p.
- Avalos, G. A. y Perez-Urria C. E. 2009. Metabolismo secundario en plantas. *Reduca. Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.
- Avila, A. J. G. 1996. Actividad anti-*vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 118 pp.
- Badui, D. S. 2006. Glucósidos. *En: Química de los alimentos*. Pearson Educación. 41-47 pp.
- (BDMTM) Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana. 2015. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: *Echeveria gibbiflora*. UNAM. México. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7406>
- Bonifaz, T. J. A. 2012. Micología medica básica. McGraw-Hill Interamericana. Distrito Federal. México. 01-09 pp.
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(1):44-52.

- Cantón, R.; García, J. E.; Gómez, L.; Martínez, L.; Rodríguez, C.; Vila, J. y García, J. A. 2000. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 54 pp.
- Cordero-Martínez, J.; Aguirre-Alvarado, C.; Guzmán-Soriano, J. G.; Sánchez-Arroyo, C. E.; Flores-Alonso, J. C. y Rodríguez-Páez, L. 2016. Effects of aqueous crude extract of *Echeveria gibbiflora* on mouse sperm function. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 1-10 pp.
- Cordiés, J. L.; Machado, R. L. A. y Hamilton, C. M. L. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*. 8(1):13-27.
- Cruz, M. C. M. 1990. Estudio sobre herviboria y demografía en *Echeveria Gibbiflora* (Crassulaceae), una planta perenne en el Pedregal de San Ángel. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 96 pp.
- Delgado, N. M.; Taboada, R. J.; Ortega, H. A.; Merchant-Larios, H.; Sánchez-Vázquez, M. L.; Ramírez, G. y Reyes, R. 1999. Effects of a purified fraction from *Echeveria gibbiflora* aqueous crude extract on guinea-pig spermatozoa. *Phytotherapy Reserch*. 13: 46-49.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de la Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México. 45-47 pp.
- García-Bores A. M. 2010. Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis de Doctorado. FES Iztacala. UNAM. 209 p.
- García, O. N. C.; Trejo, C. R.; Pedroza, S. A.; Gómez, L. F.; Esperanza, M. J. H. y Sepúlveda, B. M. 2011. Bases moleculares de la resistencia a sequía en plantas. Unidad regional universitaria de zonas áridas. Universidad Autónoma Chapingo. 65-74 pp.
- Gardziella, A.; Pilato, L. A. y Knop. 2000. Phenolic Resins. 2ª edición. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 560 p.

- (GBIF) Global Biodiversity Information Facility. 2016. <http://www.gbif.org/species/7334611> on 2016-07-31
- Goleniowski, M.; Bonfill, M.; Cusido, R. y Palazón, J. 2013. Phenolics: Classes-Occurrence, Biosynthesis, Structure and Chemistry, Distribution. *In*: Gopal, R. y Mérillon, J-M. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1751- 1975 pp.
- Gonzales, M. F. 2012. Adaptaciones de las plantas a la aridez. *En*: Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 53-84 pp.
- Goyal, S. 2013. Ecological Role of Alkaloids. *En*: Gopal, R. y Mérillon, J-M. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 149-173 pp.
- Gutiérrez, A. D. M.; Ortiz, G. C. A. y Mendoza, C. A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. 5 p.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. *En*: Storey, K. B. Functional metabolism: Regulation and adaptation. John Wiley and Sons. Hoboken, NJ. USA. 319-368 pp.
- (INEGI) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2016. Información por entidad. <http://www.inegi.org.mx/>
- Juárez-Rosete, C. R.; Aguilar-Castillo, J. A.; Juárez-Rosete, M. E.; Bugarin-Montoya, R.; Juárez-Lopez, P. y Cruz, C. E. 2013. Herbs and medicinal plants in Mexico: tradition and innovation. *Revista Bio Ciencias*. 2 (3): 119-129.
- Jürgen, R. 2009. Plant–microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. *In*: Wink, M. (eds.). *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. 2ª edición. Wiley-Blackwell. 214- 347 pp.

- Karchmer, A. W.; Archer G. L. y Dismukes W. E. 1983. Staphylococcus epidermidis causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy. *Annals of Internal Medicine*. 98 (4): 447-55.
- Koneman, E. W. 2008. Pruebas de sensibilidad a agentes microbianos. *En*: Koneman, E. W.; Allen, S.D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C. y Winn, W. C. Diagnóstico Microbiológico. México: Medica Panamericana. 902-974 pp.
- Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R. y Lamb, C. 1995. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79(4): 583-93.
- López-Angulo, G.; Montes-Avila, J.; Díaz-Camacho S. P.; Vega-Aviña, R.; Ahumada-Santos, Y. P. y Delgado-Vargas, F. 2014. Chemical composition and antioxidant, α-glucosidase inhibitor and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. Species from México. *Arabian Journal of Chemistry*. 10p.
- López-Angulo, G.; Montes-Avila, J.; Díaz-Camacho, S. P.; Vega-Aviña, R.; Báez-Flores, M. E. y Delgado-Vargas, F. 2016. Bioactive components and antimutagenic and antioxidant activities of two *Echeveria* DC. species. *Industrial Crops and Products*. 85: 38-48.
- Martínez-Ávila, G. C. G; Ascacio-Valdés, J. A.; Sepúlveda-Torre, L.; Rodríguez-Herrera; Aguilera-Carbó, A. y Aguilar. 2013. Extracción Asistida por Fermentación Fúngica de Antioxidantes Fenólicos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 5 (9): 16-24.
- Martínez-Ruiz. M. G.; Gómez-Velasco, A.; Juárez, Z. N.; Hernández, L. R. y Bach, H. 2013. Exploring the biological activities of *Echeveria leucotricha*. *Natural Product Research*. 27 (12): 1123-1126
- Mendoza, P. N.; De León, R. J. y Figueroa-Hernández, J. L. 2006. Actualidades farmacológicas: Herbolaria. *Ejournal*.  
<http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no48-6/RFM48606.pdf>

- Miguel-Espejel, M. I. 2010. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 74 p.
- Miltiados, G. y Elisaf, M. 2011. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. *Journal of medical case reports*. 5: 251.
- (OMS) Organización Mundial de la Salud. 2015. Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N° 194.
- Pérez-Calix, E. 2008. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 156. INECOL.
- Quintana, A. 2002. Antibióticos: bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. *En: Temas de Bacteriología y Virología para CEFA*. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina, Instituto de Higiene. 17 pp.
- Reyes, R.; Merchant-Larios, H.; Ortega-Hernández, A. y Delgado, N. M. 2002. Male contraception, IV: hypotonic-like effect from *Echeveria gibbiflora* on human sperm. *Archives of Andrology*. 48:443-449.
- Reyes, R.; Sánchez-Vázquez, M. L.; Merchant-Larios, H.; Ortega-Hernández, A. y Delgado, N. M. 2005. Calcium (hydrogen-1-malate) hexahydrate on *Echeveria gibbiflora* leaves and its effect on sperm cells. *Archives of Andrology*. 51:461-469.
- Sepúlveda, J. G.; Porta, D. H. y Rocha, S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (3): 355-363.
- Silva, S. J. 2006. Resistencia a antibióticos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2): 105-112.
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Society for Enology and Viticulture*. 16: 144-158.

- Smith, K.J.; Neafie, R.; Yeager J. y Skelton, H.G. 1999. *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *British Journal of Dermatology*. 141: 558-561.
- Struthers, K. J. y Westran, R. P. 2005. Bacteriología clínica. Masson. España. 49-56 pp.
- Takaichi, S. 2013. Tetraterpenes: Carotenoids. *In: Natural Products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 3252-3257 pp.
- (TPL) The Plant List. 2010. Crassulaceae. Consultado en línea el 31 de julio del 2016. <http://www.theplantlist.org/browse/A/Crassulaceae/>.
- Thiede, J. y Egli U. 2003. Crassulaceae. *In: Kubitzki, K. 2007. The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering plants-eudicots*. Vol. 9. 83-118 pp.
- Trombetta, D.; Castelli, F.; Grazia, S. M.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G. y Bisignano, G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (6): 2474–2478.
- Venereo, G. J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Military Medicine* 31 (2): 126-133.
- Whalter, E. 1972. *Echeveria*. California Academy of Sciences. 205-207 pp.
- Wang, H. y Bun, T. N. 2002. Insolation of an antifungal thaumatin-like protein from Kiwi fruits. *Phytochemistry*, 6 (1): 1-6.
- Wilson, M. 2008. Bacteriology of humans: An ecological perspective. Blackwell Publishing. 56-92 pp.
- Wink, M. 2009. Ecological function of secondary metabolites. En: Wink, M. (eds.). *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. 2ª edición. Wiley-Blackwell. 01-04 pp.
- Zamora, R.; García-Fayos, P. y Gómez-Aparicio, L. 2004. Las interacciones planta-planta y planta animal en el contexto de la sucesión ecológica.

*En:* Valladares, F. *Ecología del Bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ministerio del Medio Ambiente. Madrid. 371-393 pp.

## ANEXOS

*Anexo I: Difusión en Agar o Kirby-Baüer (Koneman, 2008).*

La prueba de difusión en agar o de Kirby-Baüer es uno de los métodos más usados y recomendados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para determinar la sensibilidad bacteriana a los distintos compuestos antimicrobianos. Este método consiste en la difusión del compuesto antimicrobiano por la superficie del agar previamente inoculado con el microorganismo. Para lo cual se colocan discos de papel secante con los distintos compuestos antimicrobianos sobre la superficie del agar, al entrar en contacto el papel secante con la superficie húmeda del agar, el papel absorbe agua y el antimicrobiano difunde radialmente a través del espesor del agar formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 24 h. de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Cantón *et al.*, 2000).

Para esta técnica es utilizado el medio de cultivo Mueller Hinton (MH) debido al buen crecimiento de las bacterias patógenas en este medio. En cajas Petri estériles es depositado el agar (previamente esterilizado en autoclave a una temperatura superior a los 100 °C), el cual debe tener una distribución uniforme por toda la caja logrando un grosor aproximado de 4 mm.

En cuanto al inóculo el procedimiento a seguir es la toma de 4 a 5 colonias bacterianas por medio de un asa de siembra depositándolas en un tubo con 10 mL de caldo MH previamente esterilizado, se mezcla bien el inóculo para asegurar la siembra y se retira el asa, depositando luego el tubo sembrado en una incubadora a 37 °C por 24 h. esperando alcanzar una concentración final de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL o una turbidez de 0.5 en la escala de MacFarland.

Una vez obtenido los cultivos se procede a impregnar las cajas Petri con los mismos, para lo cual se utilizan hisopos estériles y mediante la sumersión del hisopo en los cultivos se toman las bacterias, tocando las paredes con el hisopo se retira el exceso de muestra, sembrando mediante estría sobre el agar rotando la caja cada 60° para alcanzar una distribución uniforme de las bacterias. Una vez inoculado las cajas se procede a colocar los sensidiscos de 5 mm de diámetro previamente esterilizados e inoculados con 2 mg de los

compuestos a evaluar sobre la superficie del agar a una distancia entre discos de 22 mm y 14 mm del borde de la caja (Figura 7).

Los controles negativos utilizados son los distintos solventes utilizados para disolver los extractos, mientras que el control positivo consistió en 25  $\mu\text{g}$  de cloramfenicol. Tanto los controles negativos como los extractos a evaluar se deben preparar con un mínimo de 12 h. antes de realizar el experimento para permitir la evaporación de los solventes y evitar la interferencia de los mismos en la prueba, mientras que el control positivo se debe preparar unos momentos antes del experimento.

La interpretación de resultados se lleva a cabo mediante la medición de los halos de inhibición mediante un vernier o en su defecto con una regla, utilizando la escala de mm. Cada prueba se realiza por triplicado haciendo el promedio y reportando en mm.

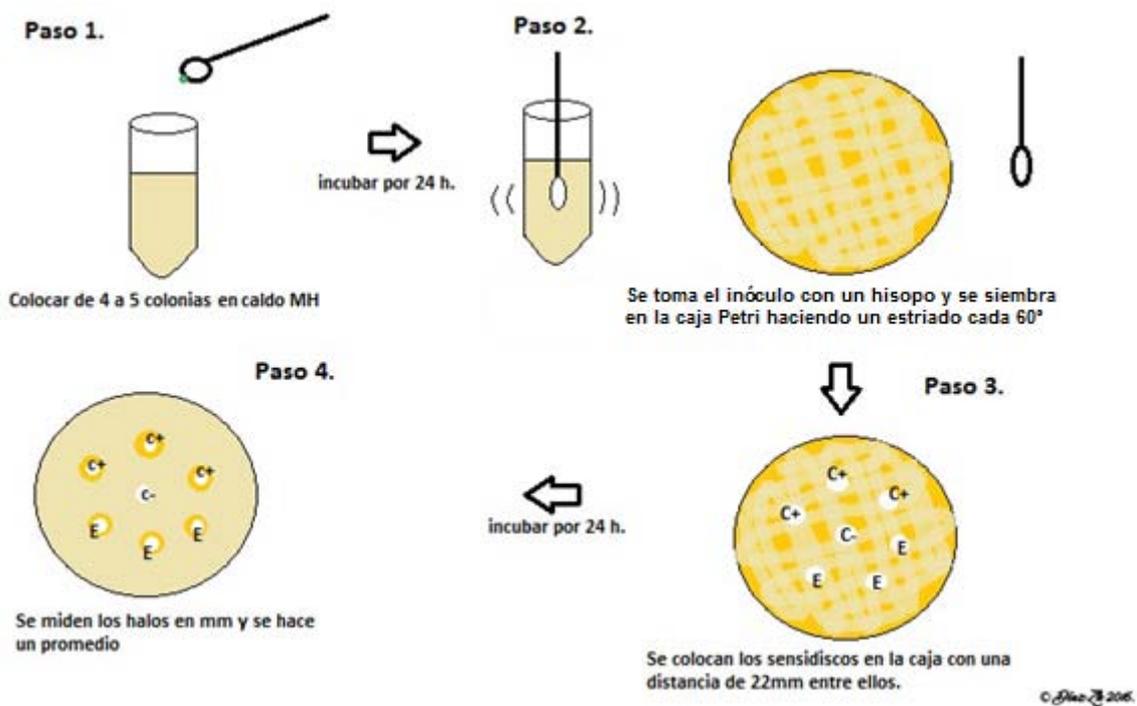


Figura 7: Proceso para inocular cajas Petri en la técnica de Kirby-Baier.

*Anexo II: Inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).*

Para esta técnica el medio de cultivo que se usa es agar papa y dextrosa (PDA) debido al buen crecimiento que presentan los hongos filamentosos en este medio.

En el caso de la prueba cualitativa se preparan sensidiscos con 2 mg de los distintos antifúngicos a analizar más el control positivo que en este caso es 56 µg de Ketoconazol.

En las cajas Petri con agar PDA se colocan los sensidiscos con los diferentes antifúngicos de manera que rodeen el centro de la caja, se procederá a colocar en el centro de la caja un fragmento de 5 mm de diámetro del micelio del hongo.

Se incuban a 23 °C por un tiempo aproximado de 72 h. hasta que el micelio se encuentre desarrollado, una vez que haya crecido se mide con una regla el halo de inhibición del crecimiento micelial en una escala de mm.

*Anexo III. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) (Koneman, 2008).*

La cuantificación de la actividad antimicrobiana de manera *in vitro* se evalúa con frecuencia mediante alguna variante de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio del cultivo (caldo o agar). Tras la incubación de los organismos, se realiza una comparación del crecimiento de los microorganismos mediante la turbidez que presenten o en su defecto por variantes de la misma técnica (Cantón *et al.*, 2000). La CMI es la concentración mínima del antibiótico que inhibe el crecimiento, mientras que la CBM es la concentración a la cual se considera que las bacterias se encuentran muertas (Struthers y Westran, 2005).

- Microdilución en caldo

Para esta técnica se necesita preparar un cultivo bacteriano tomando de 4 a 5 colonias bacterianas con un asa de siembra estéril y colocándolas en un tubo con 10 mL de caldo MH previamente esterilizado. Incubar el tubo a 37 °C por 24 h. alcanzando una concentración final de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL o una turbidez de 0.5 en la escala de MacFarland, de este inóculo se toma 0.1 mL y se diluye en 99.9 mL de solución salina al 0.9%.

Cada placa de ELISA es preparada con 50  $\mu$ L de caldo MH con las concentraciones de extracto a probar más 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana preparada anteriormente (Figura 8). Se lleva a incubar a 37 °C por 24 h. concluida la incubación se añade 50  $\mu$ L de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08%, se incuba por 30 min a una temperatura de 37 °C, formándose una pastilla de color rojizo en los pozos donde el microorganismo se encuentre vivo o incolora donde el microorganismo se encuentre muerto.

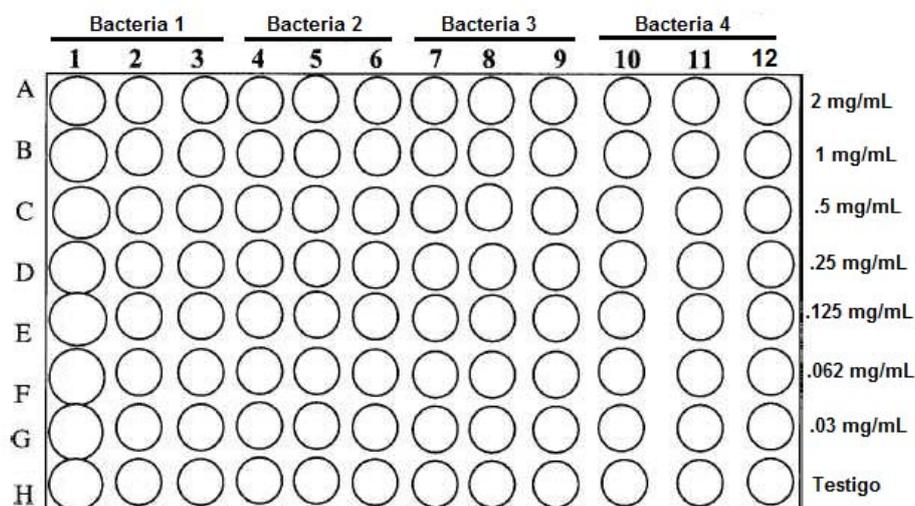


Figura 8: Placa de ELISA para las pruebas de microdilución.

*Anexo IV: Curva de letal (curva de supervivencia o efecto sobre el crecimiento)*  
(Kubo et al., 1993).

Para potenciar las defensas naturales del organismo y eliminar una infección bacteriana, el antibiótico debe estar presente a una concentración eficaz y durante el tiempo suficiente. La concentración debe ser una o varias veces superior a la CMI. Sin embargo, la concentración del antibiótico no tiene que ser tan elevada como para causar toxicidad en el paciente (Struthers y Westran, 2005).

Para esta técnica primero se deben preparar un inóculo inicial de  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL (una incubación aproximada de 12 a 18 h. a  $37^\circ\text{C}$ ), en un tubo de 10 mL de caldo MH, además de cuatro tubos con caldo MH para las concentraciones de  $\frac{1}{2}$  CMI, CMI, CBM y el grupo testigo, también se preparan tubos con solución salina al 0.08% para las posteriores diluciones.

En el tiempo cero se preparan los tubos con las concentraciones correspondientes de  $\frac{1}{2}$  CMI, CMI, CBM y testigo, agregándoles 0.1 mL del inóculo bacteriano preparado con anterioridad. Se siembra 50  $\mu\text{L}$  directamente en el agar MH de los tubos problemas en la dilución cero y se toma una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de los tubos preparados para diluirlo en un tubo con 5 mL de solución salina y se siembra en la dilución uno, se realiza el mismo procedimiento para la dilución dos (Figura 9). Este procedimiento se realiza cada dos horas durante ocho horas, pasadas las ocho horas se realiza cada seis por un periodo de 24 h. Los resultados se grafican en  $\text{Log}_{10}$  de las colonias supervivientes contra el tiempo de exposición del extracto.

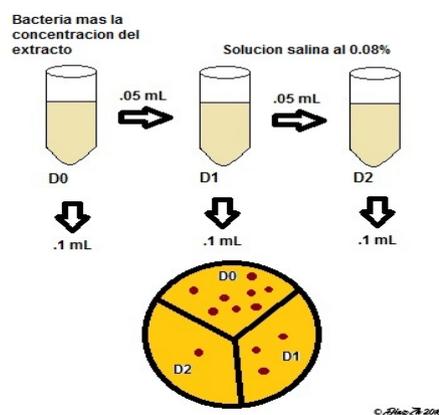


Figura 9: Proceso de dilución para la curva letal.

*Anexo V: Reducción del radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH) (García-Bores, 2010).*

En la actualidad existen diversas metodologías para medir la capacidad antioxidante, los cuales se basan en la capacidad de reducir radicales libres presentes en el medio. Uno de los métodos más usados es el método de DPPH. Éste al estar disuelto en solución metanólica presenta un color rojizo-violeta y al entrar en contacto con una molécula que pueda donar uno o más electrones, se produce una forma reducida del DPPH cambiando de color a amarillo, a este cambio de color se le mide la absorbancia (ABS) a 520 nm y se hace una relación entre la concentración y el % de reducción. El parámetro CA<sub>50</sub>, que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método, obtenido de la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de decoloración} = \left( \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) \times 100$$

A partir de una solución stock de 1 mg/mL del radical DPPH disuelto en metanol, se preparan diferentes concentraciones (100, 80, 60, 40, 20, 10 y 5 ppm). Cada una de las concentraciones finales se multiplican por cuatro para el stock final y se afora a 5 mL.

En una placa de ELISA de 96 pozos se coloca 50 µL de cada concentración más 150 µL de una solución metanólica de DPPH a una concentración de 250 µM. Como control negativo se utilizan 200 µL de metanol y como control positivo se utiliza ácido gálico (35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 ppm). La placa se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. en completa oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo se determina la ABS a 493 nm. La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de reducción.

*Anexo VI: Cuantificación de los fenoles totales (Singleton y Rossi, 1965).*

Uno de los métodos más usados para la cuantificación de fenoles totales es Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Se prepara una curva de calibración con un stock de 1 mg/mL de ácido gálico, se toman las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65  $\mu\text{g/mL}$ ) llevándolo a un volumen final de 3 mL con agua destilada. Se prepara una solución Stock de 1 mg/mL de los extractos analizados, de los cuales se toma 100  $\mu\text{L}$  y se le agregan 2900  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

A cada concentración (ácido gálico y extracto problema) se le adicionan 250  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu, dejándolo reposar por 5 minutos. Posteriormente se le adicionan 750  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (4 g/ 20 mL). Los tubos se incuban a temperatura ambiente y a completa oscuridad por una hora. Después del tiempo de reacción, se determina la ABS a 760 nm y se gráfica la concentración contra la ABS. Para obtener la curva patrón de ácido gálico se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la ABS de las muestras a evaluar. Los resultados se expresan como mg EAG/g de extracto.

*Anexo VII: Mecanismos de acción de antimicrobianos (Calvo y Martínez–Martínez, 2009; Cordiés et al., 1998).*

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por una variedad de microorganismos (bacterias, hongos, entre otros), los cuales suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente eliminarlos. Estos compuestos difieren en sus propiedades químicas, físicas y farmacológicas, así como es su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano. Por lo general se distinguen dos grupos, los bactericidas que eliminan a las bacterias siendo su efecto irreversible y los bacteriostáticos que inhiben el crecimiento bacteriano, el cual se reanuda una vez suspendido el tratamiento, sin embargo estas distinciones pueden variar dependiendo el tipo de microorganismo.

Atendiendo a su mecanismo de acción y estructura química, los principales grupos de antimicrobianos de interés clínico son los siguientes:

1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias gram positivas). La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. La inhibición de la síntesis de la pared celular tiene habitualmente un efecto bactericida.

La estructura de la pared celular es un polímero denominado peptidoglicano, cuya síntesis se divide en tres etapas principales: Inhibidores de la fase citoplásmica, Inhibidores de la fase de transporte de precursores y los inhibidores de la organización estructural del peptidoglucano. Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared necesitan para ejercer su acción que la bacteria se halle en crecimiento activo, y para su acción bactericida requieren que el medio en que se encuentre la bacteria sea isotónico o hipotónico, lo que favorece el estallido celular cuando la pared celular se pierde o se desestructura.

## 2. Antibióticos activos en la membrana citoplásmica

La membrana citoplásmica es fundamental para la regulación del medio intracelular de las bacterias controlando la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, incluso en bacterias en reposo, logrando cierta selectividad dadas las diferencias en cuanto a la composición entre bacterias y hongos.

## 3. Antimicrobianos que bloquean mecanismos de resistencia

Las bacterias presentan una serie de enzimas que las ayudan a inactivar ciertos compuestos antimicrobianos, de los más importantes están las betalactamasas, las cuales son capaces de hidrolizar el anillo betalactámico e inactivar el antibiótico. Los agentes antimicrobianos más importantes en este grupo son los inhibidores de las betalactamasas. Carecen (habitualmente) de acción antibacteriana intrínseca de verdadera importancia clínica, pero se unen irreversiblemente a algunas betalactamasas, protegiendo de su acción a los antibióticos betalactámicos.

## 4. Antibióticos inhibidores de la síntesis proteica

La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. El ribosoma consta de 2 subunidades denominadas 30s y 50s, en esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos, los cuales bloquean la acción de los ARN mensajeros, este bloqueo en ocasiones es reversible. La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática. La acción bactericida o bacteriostática también va a depender de las concentraciones del antimicrobiano, y del microorganismo afectado. Los antimicrobianos de este grupo pueden actuar en diferentes fases de la síntesis proteica, dividiéndose en: inhibidores de la fase de activación,

inhibidores del inicio de la síntesis proteica, inhibidores de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma y los inhibidores de la elongación.

5. Antibióticos que actúan en el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos.

Las bacterias al igual que todos los organismos presentan los procesos de replicación y duplicación del ADN, lo cual se realiza en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos. Por lo general, los antibióticos de este grupo no son particularmente selectivos en su acción y comportan cierta toxicidad para las células eucarísticas. La mayoría de los antibióticos que actúan sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes del inóculo y de la fase de crecimiento bacteriano.

6. Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos

Para obtener determinados elementos esenciales como los aminoácidos o las bases púricas y pirimidínicas de los nucleótidos, se requiere la síntesis de folatos, que algunas bacterias son incapaces de obtener del medio, a diferencia de las células eucariotas. Por lo cual se emplean antimicrobianos que inhiban esta síntesis.