



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA  
DE *Sida ciliaris* L.**

**TESIS**

**QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE BIÓLOGA**

**ORTIZ PARRA VALERIA GUADALUPE**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM, mi casa de estudios, por darme la oportunidad de formarme, crecer y superarme académicamente.

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado, Dra. Nani, por abrirme las puertas en el laboratorio, su guía, enseñanza, paciencia, por nunca dejar de confiar en mí e impulsarme a ser mejor cada día. Mi mayor admiración, respeto y cariño.

A la Dra. Rocío Serrano Parrales, mi querida Dra. Chío, por siempre estar incondicionalmente, por su guía en cada paso, dedicación, por su infinita paciencia, motivación, comprensión y por cada plática y consejo. Todo mi aprecio y afecto.

Al Dr. Guillermo Ávila Acevedo, Doc Memo, por contagiar su pasión por la ciencia, por las interesantes clases, su enseñanza y por siempre hacer más amena cualquier situación. Gracias por todo, mi mayor admiración.

A la Dra. Ana María García Bores, Dra. Anita, por su enseñanza, guía, su increíble paciencia, emoción, hermosas clases, y por compartir toda su sabiduría. Todo mi aprecio y respeto.

A la M. en C. Julieta Orozco Martínez, Mtra. July, por todas sus aportaciones, tutela, guía y por siempre solucionar dudas de la mejor manera. Gracias por todo.

A Erick y Gelos, por esas tardes de pláticas, risas y consejos, por su guía y apoyo dentro del laboratorio. Gracias por todo.

A los profesores y compañeros de los laboratorios de Farmacognosia y Fitoquímica, por su constante apoyo, tutela, comidas y risas. Todo mi afecto y respeto.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 1  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 3  |
| JUSTIFICACIÓN.....   | 6  |
| HIPÓTESIS .....  | 6  |
| OBJETIVOS .....  | 7  |
| METODOLOGÍA .....  | 8  |
| Colecta de la planta .....   | 8  |
| RESULTADOS .....   | 11 |
| Identificación taxonómica y datos etnobotánicos .....  | 11 |
| Rendimiento de los extractos .....   | 12 |
| Identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos de <i>S. ciliaris</i> ..... | 13 |
| Actividad antibacteriana de <i>S. ciliaris</i> .....   | 14 |
| Actividad antifúngica de <i>S. ciliaris</i> .....  | 18 |
| DISCUSIÓN.....   | 22 |
| Rendimiento de los extractos y fitoquímica .....   | 22 |
| Evaluación de la actividad antibacteriana .....  | 24 |
| Curvas de crecimiento bacteriano.....  | 26 |
| Evaluación de la actividad antifúngica .....   | 28 |
| CONCLUSIONES.....  | 30 |
| LITERATURA CITADA.....   | 31 |
| APÉNDICES.....   | 37 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Antecedentes de especies del género <i>Sida</i> .....                           | 4  |
| Tabla 2.- Datos del herbario y etnobotánicos de <i>S. ciliaris</i> . ....                | 11 |
| Tabla 3.- Caracterización fitoquímica de los extractos de <i>S. ciliaris</i> . ....      | 13 |
| Tabla 4.- Actividad antibacteriana (cualitativa y cuantitativa) de <i>S. ciliaris</i> .. | 14 |
| Tabla 5.- Actividad antifúngica (cualitativa) de <i>S. ciliaris</i> .....                | 18 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.- Rendimiento de los extractos de <i>S. ciliaris</i> .....  | 12 |
| Figura 3.- Efecto del extracto de acetato de etilo sobre la curva de crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> .....   | 16 |
| Figura 4.- Efecto del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> .....  | 17 |
| Figura 5.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>F. sporotrichum</i> con las distintas concentraciones de los extractos hexánico y de acetato de etilo | 19 |
| Figura 6.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>A. niger</i> con las distintas concentraciones de los extractos metanólico y hexánico.....            | 20 |
| Figura 7.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>T. mentagrophytes</i> con las diferentes concentraciones del extracto metanólico .....                | 21 |
| Figura 8.- <i>Sida ciliaris</i> L. Iconografía Mutisiana: 2133 Real Jardín Botánico, Madrid.....   | 37 |

## RESUMEN

La medicina tradicional deriva del uso ancestral de las plantas, ya que estas poseen compuestos que les permiten protegerse contra el ataque de patógenos, herbivoría, radiación y competencia; a estos se les conoce como metabólicos secundarios, que son compuestos de bajo peso molecular que presentan propiedades plaguicidas, anticarcinogénicas, antihelmínticas, antibacterianas, antivíricas, antifúngicas, entre otras.

La gran diversidad de México en cuanto a plantas vasculares se traduce con una alta tradición etnobotánica, ya que de las más de 25,000 especies, la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI) registró alrededor de 3,000 con aplicaciones medicinales. Dentro de estas se tiene registró de diversas plantas de la familia Malvaceae, *Sida ciliaris* L. entre ellas.

Ya que no se cuentan con estudios que comprueben el uso de la mayoría las especies del género *Sida* dentro de la medicina tradicional mexicana se tiene como objetivo del estudio evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de *S. ciliaris*.

La especie fue colectada en la reserva de la biosfera Valle de Tehuacán-Cuicatlán, con número de colecta JOM040 y depositandose un ejemplar en el herbario IZTA. Primeramente se obtuvieron los extractos por el método de maceración en solventes de polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo y metanol) y se realizaron pruebas de caracterización fitoquímica por métodos cualitativos.

Se evaluó la actividad antibacteriana cualitativamente por el método de Kirby-Baüer y cuantitativamente por la microtécnica de dilución en caldo y curvas de sobrevivencia bacteriana. Para la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial y se determinó la concentración fungicida media para la prueba cuantitativa; para los hongos levaduriformes se evaluó su sensibilidad de la misma manera que a as cepas bacterianas.

En cuanto a la actividad antibacteriana los tres extractos de *S. ciliaris* demostraron tener actividad frente a *Klebsiella pneumoniae*; a concentraciones altas se presenta un efecto bactericida y a concentraciones medias bacteriostático. En la actividad antifúngica el extracto metanólico inhibió a *Aspergillus niger* ( $CF_{50} = 2.6$  mg/mL) y *Tricophyton mentagrophytes* (Inhibición radial de un 20%); el extracto de acetato de etilo inhibió a *Fusarium sporotichum* (Inhibición radial de un 20%) y finalmente el extracto hexánico inhibió a *A. niger* ( $CF_{50} = 3.02$  mg/mL) y a *F. Sporotichum* ( $CF_{50} = 4.7$  mg/mL). Las cepas de hongos levaduriformes no demostraron sensibilidad frente a los extractos.

Con los resultados obtenidos se comprueba el uso de *S. ciliaris* en la medicina tradicional.

## INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, el desarrollo de las sociedades humanas y su cultura tienen relación con el conocimiento de la biodiversidad. Gran parte del esplendor de las antiguas culturas se relaciona con el conocimiento que poseían los naturales prehispánicos acerca del uso, las propiedades y las cualidades de una gran cantidad de especies vegetales (Rendón *et al.*, 2001). La íntima relación que existía y que en la actualidad persiste entre el ser humano y la flora ha permitido que este aproveche las ventajas que éstas le brindan, ya sea como alimento o dentro de la medicina tradicional (Hernández, 2001).

La medicina tradicional es uno de los pilares principales en la prestación de servicios de la salud en todo el mundo, a menudo es subestimada pero su demanda va en aumento, ya que una medicina tradicional de calidad, seguridad y eficacia comprobada contribuye a asegurar el acceso a todas las personas a la atención de salud. Cada vez son más los países que reconocen la importancia de esta dentro de la salud por lo que se han dado a la tarea de generar un mayor acceso a la información etnobotánica, así como promover la integración, reglamentación y supervisión adecuada para este campo de la medicina (OMS, 2013).

Las plantas poseen compuestos que les permiten protegerse contra el ataque de otros organismos, así como para procesos de adaptación a su ambiente (Sepúlveda *et al.*, 2004); a estos compuestos se les conoce como metabolitos secundarios (MS) (Croteau *et al.*, 2000), que son compuestos de bajo peso molecular que presentan propiedades plaguicidas, anticarcinogénicas, antihelmínticas, antibacterianas, antivíricas o antifúngicas (Alonso, 2007), siendo estos la base de la medicina tradicional (Berlin *et al.*, 2001)

La riqueza biológica de México, su diversidad cultural así como su larga historia se ha traducido en el desarrollo una vasta tradición etnobotánica (Caballero y Cortés, 2001); la cual se manifiesta en un gran potencial de investigación para el desarrollo de nuevos fármacos a partir de los MS producidos por las plantas (Sarukhán *et al.*, 2009).



En el país se han reconocido aproximadamente 25,000 especies de plantas vasculares, de las cuales la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI) registró alrededor de 3,300 especies con aplicaciones medicinales (Sarukhán *et al.*, 2009).

Dentro de las plantas citadas por la CDI se encuentran algunas especies pertenecientes a la familia Malvaceae, siendo ***Sida ciliaris* L.** una de ellas. Esta es una hierba perenne de un poco más de 30 cm, con flores solitarias de tonalidades de salmón a amarillentas y hojas simples alternas, se distribuye desde Texas hasta Brasil, además de encontrarla en todo México donde se utiliza como remedio contra la tos (Apéndice I).

Sobre *S. ciliaris* no se han realizado estudios que comprueben su uso dentro de la medicina tradicional hasta el momento, pero otras especies del mismo género han sido sometidas a investigación, algunos estudios realizados a estas se citan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Antecedentes de especies del género *Sida*

| Autor                       | Especie               | Estudio   |
|-----------------------------|-----------------------|---|
| Karou <i>et al.</i> , 2005a | <i>S. acuta</i>       | Estudiaron la actividad antimicrobiana de los alcaloides de la especie, encontrando que los ensayos con bacterias Gram-positivas presentaban una mayor zona de inhibición. Se identificaron a la criptolepina y quindolina como los alcaloides principales.       |
| Brugés y Reguero, 2007      | <i>S. rhombifolia</i> | Realizaron un estudio tóxico, genotóxico y antimicrobiano de la especie. Se describe un alto contenido de alcaloides y poco de flavonoides y triterpenoides. Se presentó una toxicidad y genotoxicidad mayor por parte de los extractos etanólicos de las raíces. |

|                              |                      |   |
|------------------------------|----------------------|---|
| Carmona <i>et al.</i> , 2008 | <i>S. ciliaris</i> , | Realizaron un estudio etnobotánico de 26 plantas que crecen en la ciudad de Mérida, Venezuela, donde describieron que la especie es utilizada como expectorante y antiinflamatoria  |
| Konaté <i>et al.</i> , 2012  | <i>S. alba</i>       | Elaboraron un estudio de la actividad antimicrobiana de polifenoles extraídos de la especie, éstas fracciones ricas en polifenoles por si solas probaron tener actividad antimicrobiana o cuando se aplican con otros fármacos. |

## JUSTIFICACIÓN

México presenta una elevada tradición en el uso de plantas en la medicina por lo que es importante validar su acción. La mayoría de las especies del género *Sida* no cuentan con un estudio detallado que justifique su uso dentro de la medicina tradicional, siendo este el caso de *S. ciliaris*.

## HIPÓTESIS

Se ha reportado que las plantas del género *Sida* presentan diversos metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, entre otras, por lo cual es probable que *S. ciliaris* presente actividad antimicrobiana.

# OBJETIVOS

## General

- o Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de *S. ciliaris*

## Particulares

- o Obtener los extractos de distinta polaridad de *S. ciliaris* y determinar su rendimiento.
- o Determinar cualitativamente la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos de *S. ciliaris*.
- o Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad antimicrobiana de los extractos de *S. ciliaris*.
- o Evaluar el efecto de los extractos activos mediante la curva de crecimiento de poblaciones microbianas.

## METODOLOGÍA

### Colecta de la planta

La planta fue colectada en el Valle Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán (RBTC), dentro de la localidad San Rafael, Coxcatlán, Puebla entre las coordenadas UTM Xmax: 715000, Ymax: 1981900 y Xmin: 712300, Ymin; 1979200, a una altitud de 545 msnm. Se llevó un ejemplar al herbario IZTA para su identificación, teniendo como número de colecta: JOM040.

### Obtención de los extractos

Los extractos de *S. ciliaris* se obtuvieron de las partes aéreas (tallos y hojas) secas y fragmentadas por el método de maceración (Ávila, 1996) utilizando solventes de polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo y metanol). Una vez obtenidos los extractos se procedió a filtrarlos, posteriormente se destiló el exceso de solvente a presión reducida en un rotavapor. Los extractos se colocaron en recipientes de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente y finalmente se determinó el rendimiento total a partir de 53.7 g de peso de la planta seca.

### Caracterización fitoquímica de los extractos activos

Los extractos se analizaron mediante las pruebas cualitativas descritas por Domínguez en 1979 (Apéndice II), de presencia y/o ausencia de alcaloides (Dragendorf y Mayer), fenoles ( $\text{FeCl}_3$ ), taninos (gelatina al 1%), glicósidos (Molish), monoterpenos (vainilla y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), cumarinas (NaOH), saponinas (prueba de espuma), esteroides y triterpenos (Lieberman-Buchard).

### Actividad antibacteriana

Microorganismos utilizados para los bioensayos:

Cepas bacterianas gram positivas: *Staphylococcus aureus* cc, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 23MR, *S. aureus* FES-C, *S. aureus* CUSI, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S.*

*epidermidis* FES-C, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 y *Enterococcus faecalis* ATCC 14506.

Cepas bacterianas gram negativas: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar ATCC 7251, *S. typhi*, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter gergoviae* ATCC 33028, *E. aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* 82MR, *E. coli* CUSI, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Vibrio cholerae* ATCC 39540 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### **Evaluación Cualitativa de la Actividad Antibacteriana**

Se empleo el método de Kirby-Baüer (Apendice III). En cada sensidisco se colocaron 2 mg de los extractos a evaluar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo sensidiscos con 10 µL de cada uno de los solventes empleados. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Koneman *et al.*, 1996).

### **Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antibacteriana**

Los extractos y cepas que presentaron un resultado positivo en la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, se emplearon para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por medio de la microtécnica de dilución en caldo (Apéndice VI), utilizando concentraciones de 0.25 a 9.0 mg/mL y un grupo testigo, cada una con tres repeticiones (Koneman *et al.*, 1996).

### **Curvas de sobrevivencia**

Se realizaron con las cepas bacterianas más sensibles en la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana, posteriormente se llevó a cabo el monitoreo del crecimiento de las poblaciones bacterianas en 7 tiempos durante 24 horas (Apéndice V), mismas que se expusieron a diferentes concentraciones de los extractos activos (1/2CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Ávila, 1996).

### **Actividad Antifúngica**

Hongos filamentosos: *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum*, *F. moniliforme* y *Aspergillus niger*.

Hongos levaduriformes: *Candida albicans* 17MR, *C. glabrata* cc y *C. tropicalis* cc.

### **Evaluación Cualitativa de la Actividad Antifúngica**

Para las cepas de hongos filamentosos se empleo el método de inhibición de crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se impregnaron sensidiscos con 2 mg del extracto, como control negativo se utilizaran sensidiscos con 10  $\mu$ L de cada uno de los solventes empleados y como control positivo sensidiscos con 56  $\mu$ g de Ketoconazol. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice VI). La evaluación para las cepas levaduriformes se llevó acabo con el método de difusión de Kirby-Baüer mencionado anteriormente, se utilizó como control positivo 30  $\mu$ g de nistatina y como control negativo 10  $\mu$ L de cada uno de los solventes empleados.

### **Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antifúngica**

Para la determinación de la Concentración Fungicida Media ( $CF_{50}$ ) se utilizó el método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) en cepas de hongos filamentosos (Apéndice VII). Como medio de cultivo se empleo agar de papa dextrosa (PDA). Las concentraciones para cada bioensayo fueron de 0.25 a 2.0 mg/mL. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS

### Identificación taxonómica y datos etnobotánicos

El material vegetal fue identificado como *Sida ciliaris* L., con el número de colecta JOM040 (Tabla 2).

Tabla 2.- Datos del herbario y etnobotánicos de *S. ciliaris*.

|                 |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| Orden           | Malvales                    |
| Familia         | Malvaceae                   |
| Género          | <i>Sida</i>                 |
| Especie         | <i>S. ciliaris</i>          |
| Nombre común    | Abrojo o cordón de ovispo   |
| Parte utilizada | Parte aerea                 |
| Forma de uso    | Infusión o té               |
| Afección        | Expectorante contra el asma |
| # colecta       | JOM040                      |



## Rendimiento de los extractos

La maceración se realizó a partir de 53.7g de la parte área de la planta seca. El extracto metanólico de *S. ciliaris* fue el que presentó el mayor rendimiento (8.14%), seguido del hexánico (2.16%), mientras que el extracto de acetato de etilo presentó el menor rendimiento (1.06%) (Figura 1). Lo anterior indica una concentración mayor de MS polares.

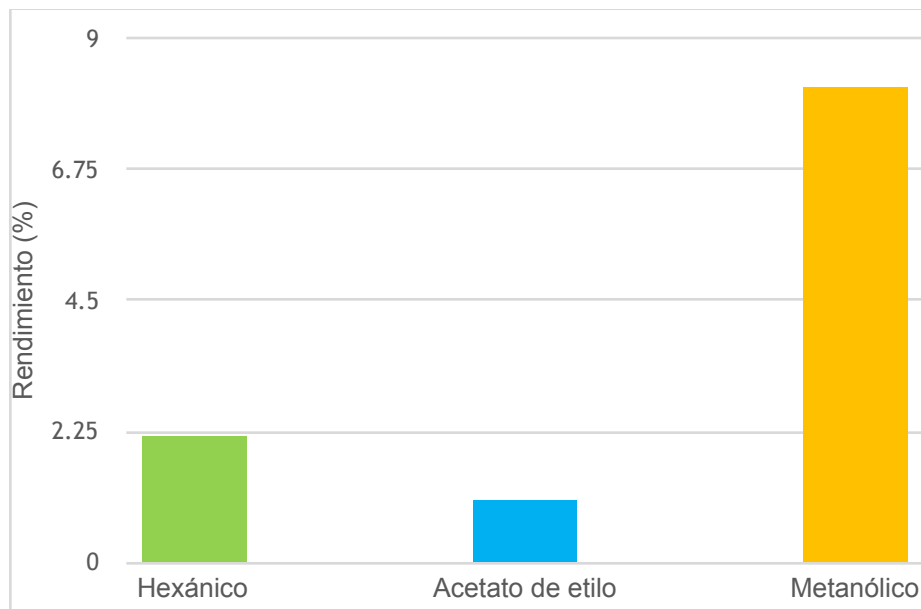


Figura 1.- Rendimiento de los extractos de *S. ciliaris*

## Identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos de *S. ciliaris*

La caracterización de los principales grupos de MS se observa en la tabla 3, donde el extracto metanólico presentó una reacción positiva para fenoles, taninos, glucósidos, saponinas, flavonoides y monoterpenos. Mientras que el extracto de acetato de etilo se encontraron fenoles, saponinas y monoterpenos. Por último, el extracto hexánico fue el único donde se presentaron alcaloides, además de monoterpenos.

Tabla 3.- Caracterización fitoquímica de los extractos de *S. ciliaris*.

| Grupo                           | Hexano | Acetato de etilo | Metanol |
|---------------------------------|--------|------------------|---------|
| Fenoles                         | -      | +                | +       |
| Taninos                         | -      | -                | +       |
| Alcaloides (Dragendorf / Mayer) | + / +  | - / -            | - / -   |
| Glucósidos                      | -      | -                | +       |
| Saponinas                       | -      | +                | +       |
| Flavonoides                     | -      | -                | +       |
| Monoterpenos                    | +      | +                | +       |

+/presente -/ausente

## Actividad antibacteriana de *S. ciliaris*

### ***Evaluación cualitativa***

Los resultados obtenidos muestran que los extractos presentan una actividad específica frente a las cepas bacterianas. Los tres extractos (hexánico, acetato de etilo y metanólico) presentaron actividad únicamente sobre una cepa, *K. pneumoniae* ATCC 13883 y mostró un halo de inhibición igual para los tres extractos ( $6.0 \pm 0.0$  mm) (Tabla 4). El espectro de acción de los extractos fue específico sobre esta cepa gran negativa.

### ***Método cuantitativo***

Las pruebas cuantitativas muestran que los tres extractos presentan efecto inhibitorio sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883, con CMI's de 2 a 6 mg/mL y CBM's de 3 a 9 mg/mL (Tabla 4).

Tabla 4.- Actividad antibacteriana (cualitativa y cuantitativa) de *S. ciliaris*

| Cepa          | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |                |
|---------------|------------------------------|----------------|
| Hexano        | Halo                         | $6.0 \pm 0.0$  |
|               | CMI                          | $2.0 \pm 0.0$  |
|               | CBM                          | $3.0 \pm 0.0$  |
| Acetato       | Halo                         | $6.0 \pm 0.0$  |
|               | CMI                          | $3.0 \pm 0.0$  |
|               | CBM                          | $6.0 \pm 0.0$  |
| Metanol       | Halo                         | $6.0 \pm 0.0$  |
|               | CMI                          | $6.0 \pm 0.0$  |
|               | CBM                          | $9.0 \pm 0.0$  |
| Cloranfenicol | Halo                         | $27.0 \pm 0.0$ |
|               | CMI                          | $1.0 \pm 0.0$  |
|               | CBM                          | $5.0 \pm 0.0$  |

Halo de inhibición dado en mm, CMI y CBM dado en mg/mL

## Efecto de los diferentes extractos sobre las curvas de crecimiento bacteriano

El efecto del extracto hexánico de *S. ciliaris* sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Figura 2) muestra que el grupo testigo presentó un crecimiento de manera exponencial, lo cual es un comportamiento normal de la cepa bacteriana. La  $\frac{1}{2}$  CMI (1.0 mg/mL) presentó un comportamiento similar al testigo, pero a las primeras 2 horas decayó su crecimiento de 5 a 4.3 log<sub>10</sub> UFC/mL, aunque posteriormente retomó su crecimiento a las 6 horas. En cuanto a la CMI (2.0 mg/mL) se observa un decaimiento durante las 4 primeras horas de 5 a 1.6 log<sub>10</sub> UFC/mL, posteriormente aumenta su número hasta estabilizarse en 5.3 log<sub>10</sub> UFC/mL observándose un efecto bacteriostático a esta concentración de dicho extracto. Por otro lado, la CBM (3.0 mg/mL) presentó un efecto bactericida a las 2 horas sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883, ya que hay un descenso de 3.4 a 0 log<sub>10</sub> UFC/mL efecto que se mantiene durante el resto de las 24 horas.

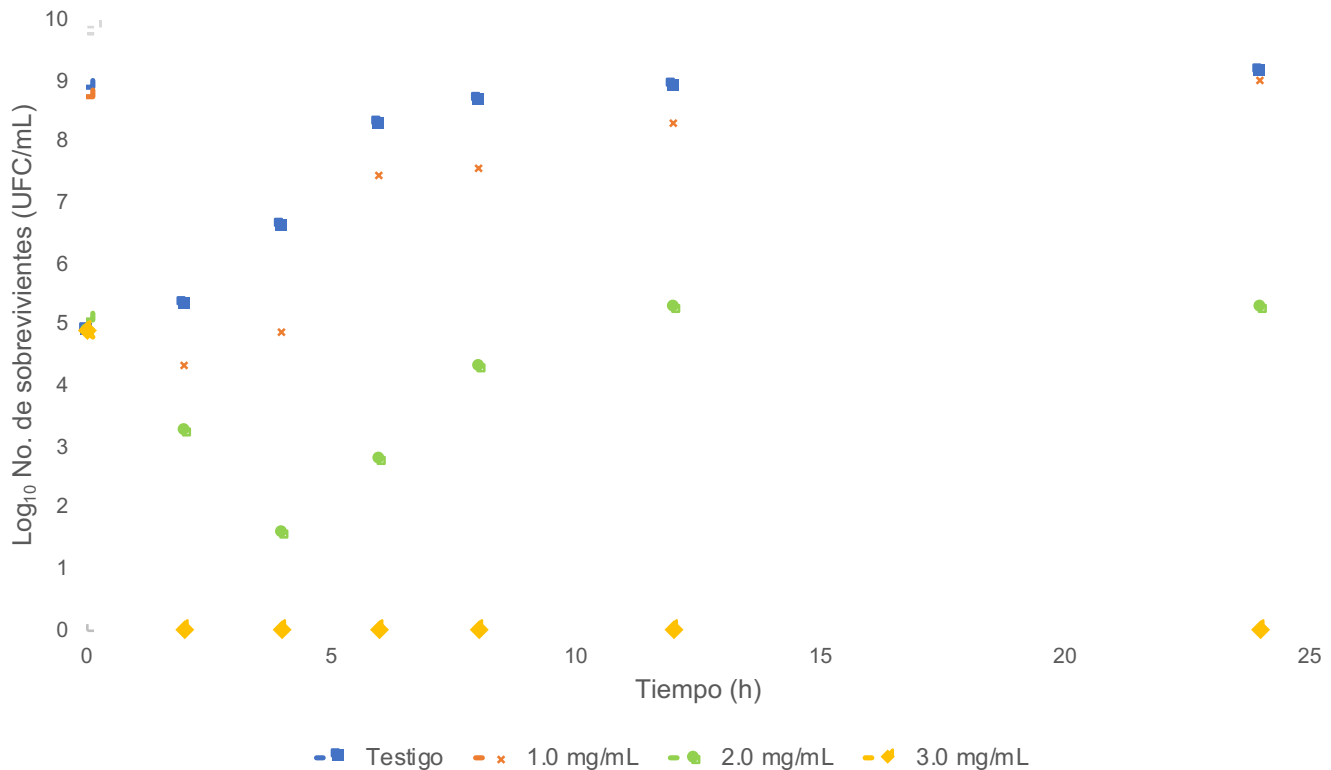


Figura 2.- Efecto del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae*.

El efecto del extracto de acetato de etilo sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Figura 3) muestra que el grupo testigo tuvo un crecimiento exponencial de 5.5 a 9.2 log<sub>10</sub> UFC/mL, lo que indica un crecimiento normal. La ½ CMI (1.5 mg/mL) presentó un crecimiento exponencial, colocándose los UFC/mL con valores ligeramente más bajos que el grupo testigo. Se observa un efecto bacteriostático por parte del extracto en la CMI (3.0 mg/mL), a lo largo de 12 horas se mantienen las 6 log<sub>10</sub> UFC/mL. Finalmente, en la CBM (6.0 mg/mL) se observa un descenso notable de 5.5 a 1.3 log<sub>10</sub> UFC/mL durante las primeras dos horas, posteriormente hay una caída a las 4 horas de 1.3 a 0 log<sub>10</sub> UFC/mL efecto que se mantiene transcurridas las 24 horas, lo cual muestra que a dicha concentración del extracto de acetato de etilo de *S. ciliaris* presenta un efecto bactericida sobre la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883.

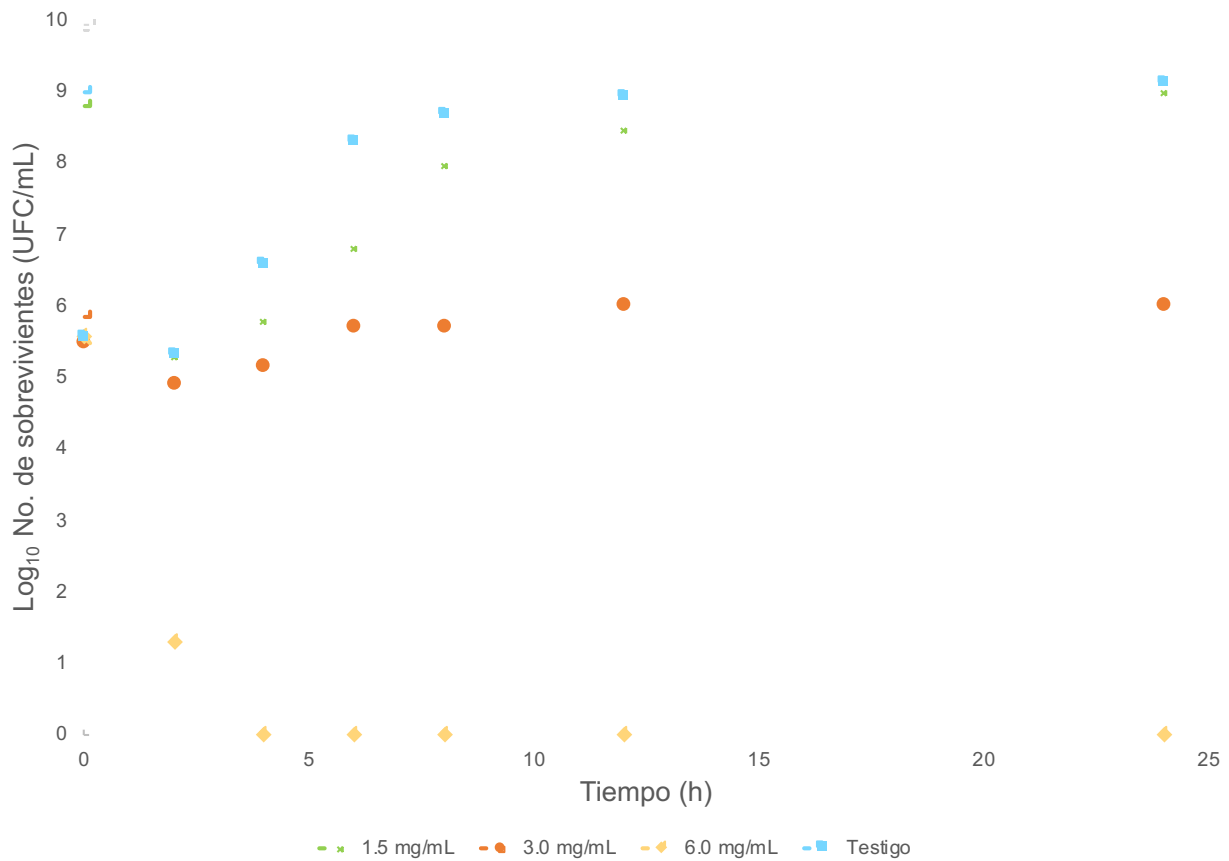


Figura 3.- Efecto del extracto de acetato de etilo sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae*

Finalmente, el efecto del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Figura 4) muestra al igual que en los efectos de los extractos hexánico y de acetato de etilo un crecimiento exponencial en cuanto a la ½ CMI (3.0 mg/mL) que de igual manera se mantuvo con valores más bajos de log<sub>10</sub> UFC/mL que el testigo. Además, se encontró un efecto bacteriostático por parte de la CMI (6.0 mg/mL), ya que sólo hay un incremento de 5 a 6 log<sub>10</sub> UFC/mL durante las 24 horas. Por último, la CBM (9.0 mg/mL) presentó primeramente un decaimiento leve entre cada intervalo de tiempo que va de 5 a 2.6 log<sub>10</sub> UFC/mL desde la hora 0 hasta las 8 horas y posteriormente se muestra un efecto bactericida transcurridas las 12 horas. El extracto metanólico de *S. ciliaris* presenta un efecto bactericida sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883 a concentraciones >9 mg/mL.

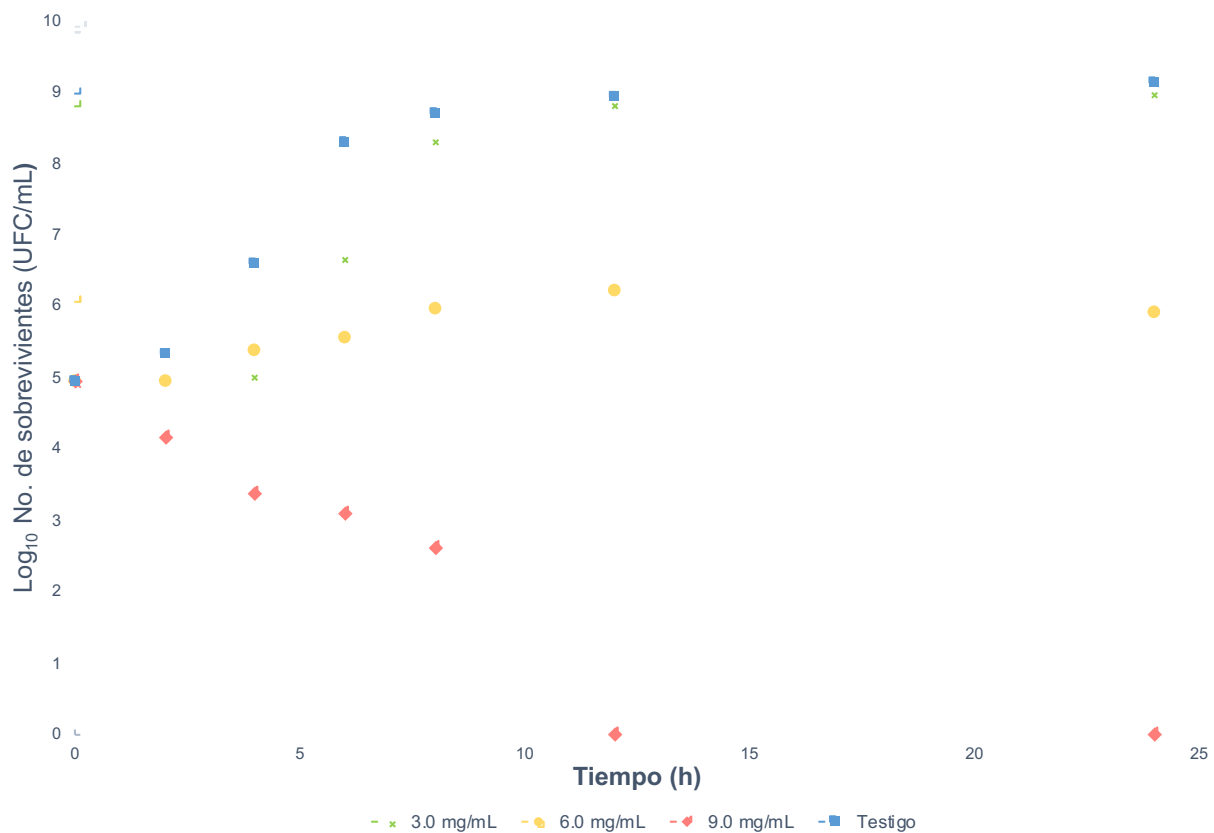


Figura 4.- Efecto del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento de *K. pneumoniae*

## Actividad antifúngica de *S. ciliaris*

### **Evaluación cualitativa**

Los resultados obtenidos muestran que la sensibilidad de las cepas fúngicas frente a los diferentes extractos de *S. ciliaris* es variable (Tabla5). El extracto metanólico inhibió a dos cepas de hongos miceliados, *A. niger* y *T. metagrophytes*, siendo el único extracto capaz de inhibir el crecimiento de este último. Igualmente, el extracto hexánico inhibió a dos cepas *A. niger* y *F. sporitrichum*. El extracto de acetato de etilo inhibió únicamente a *F. sporitrichum*, siendo específico contra esta cepa.

Los extractos únicamente tuvieron actividad sobre hongos filamentosos.

Tabla 5.- Actividad antifúngica (cualitativa) de *S. ciliaris*

|                                   | <b>Hexano</b> | <b>Acetato de etilo</b> | <b>Metanol</b> |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------|----------------|
| <b>Hongos levaduriformes</b>      |               |                         |                |
| <i>Candida albicans</i>           | -             | -                       | -              |
| <i>Candida glabrata</i>           | -             | -                       | -              |
| <i>Candida tropicalis</i>         | -             | -                       | -              |
| <b>Hongos filamentosos</b>        |               |                         |                |
| <i>Trichophyton metagrophytes</i> | -             | -                       | +              |
| <i>Aspergillus niger</i>          | +             | -                       | +              |
| <i>Fusarium moniliforme</i>       | -             | -                       | -              |
| <i>Fusarium sporotrichum</i>      | +             | +                       | -              |

(+) activo, (-) no activo

### Evaluación cuantitativa

En cuanto a la evaluación de la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>), se probaron los extractos hexánico y de acetato de etilo sobre *F. sporotrichum* (Figura 5), y como se puede observar el extracto de acetato de etilo logro inhibir sólo un 20% del crecimiento radial a la concentración más alta probada (4 mg/mL). El extracto hexánico logró inhibir hasta el 25% del crecimiento y realizando una extrapolación se obtuvo su CF<sub>50</sub>= 4.72 mg/mL.

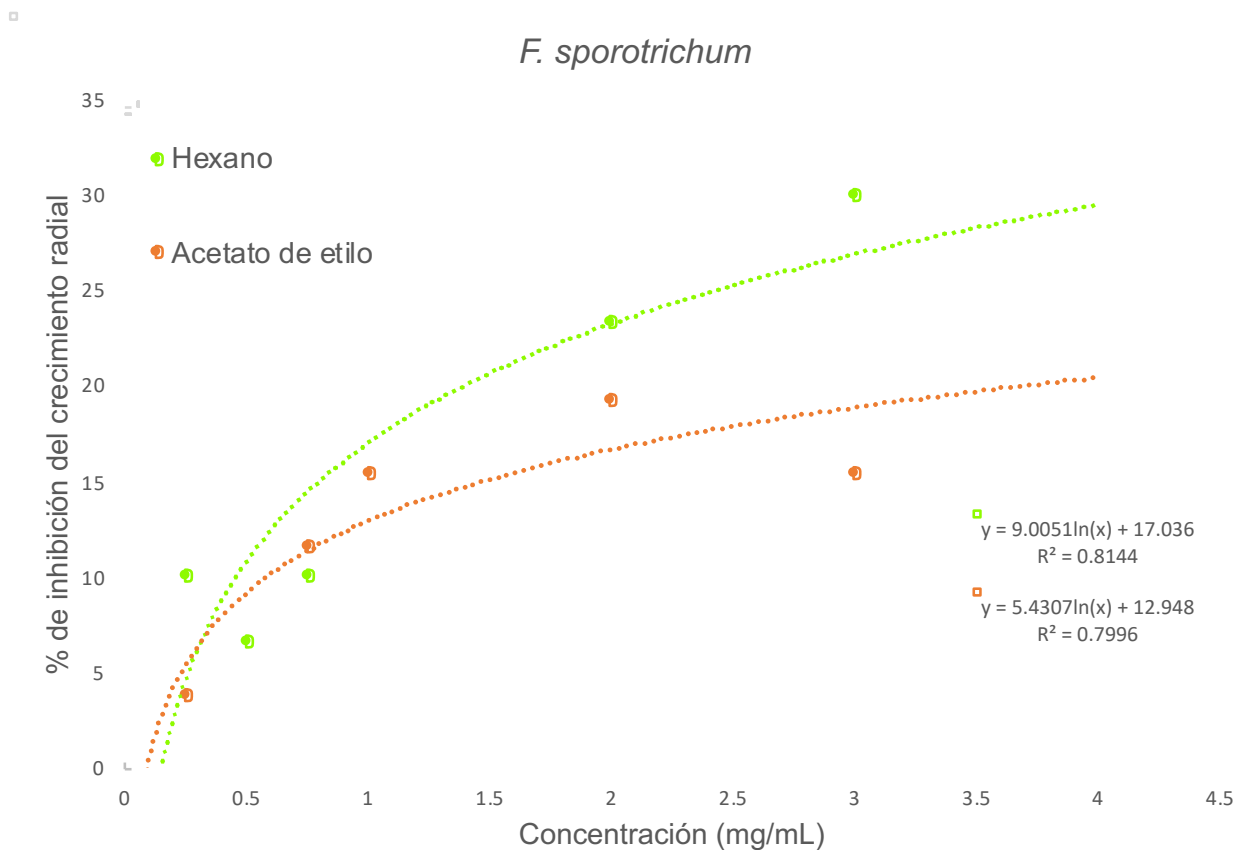


Figura 5.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *F. sporotrichum* con las distintas concentraciones de los extractos hexánico y de acetato de etilo



Se probaron los extractos hexánico y metanólico sobre *A. niger* (Figura 6) obteniendo que el extracto metanólico sobre dicha cepa presentó una  $CF_{50}$  = 2.64 mg/mL, mientras que el extracto hexánico presentó una  $CF_{50}$  mayor con 3.02 mg/mL.

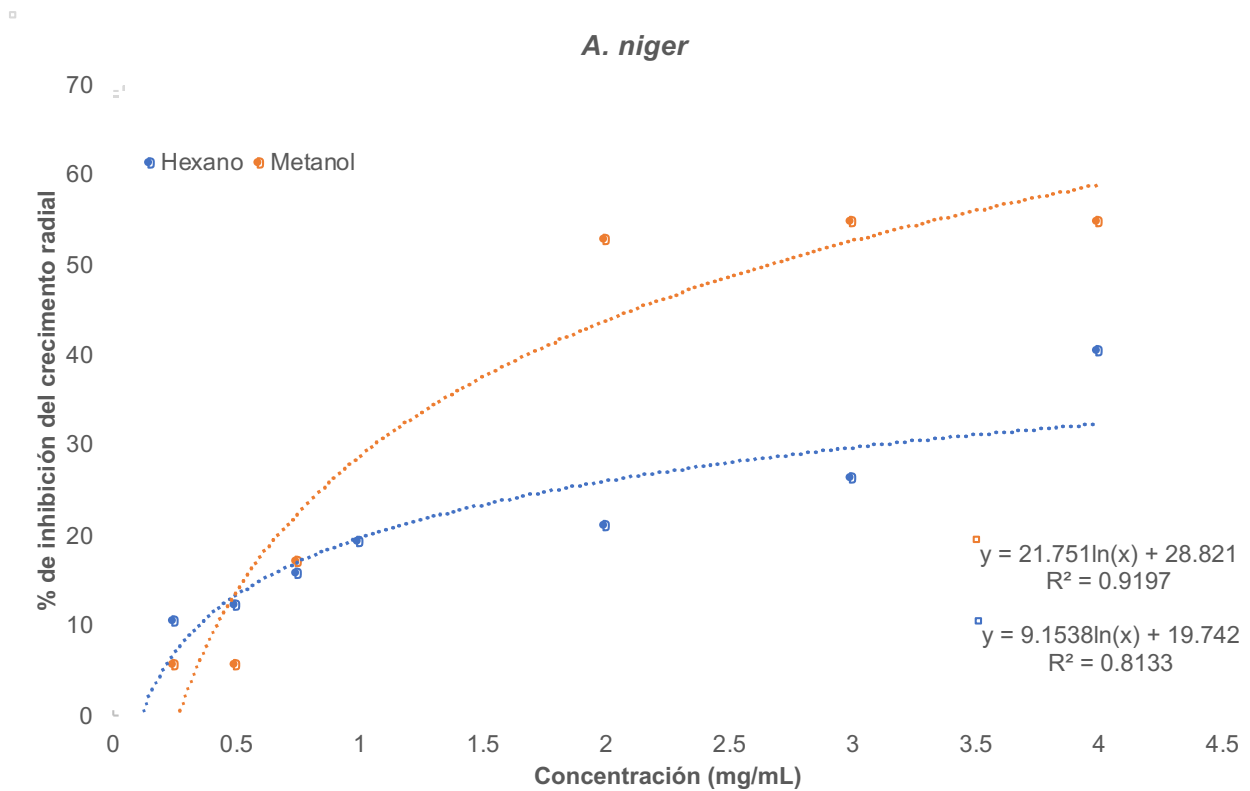


Figura 6.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *A. niger* con las distintas concentraciones de los extractos metanólico y hexánico

Finalmente, en la evaluación de la actividad del extracto metanólico sobre *T. mentagrophytes* (Figura 7) se observa que dicho extracto inhibió un 19% del crecimiento radial a la concentración más alta (4 mg/mL).

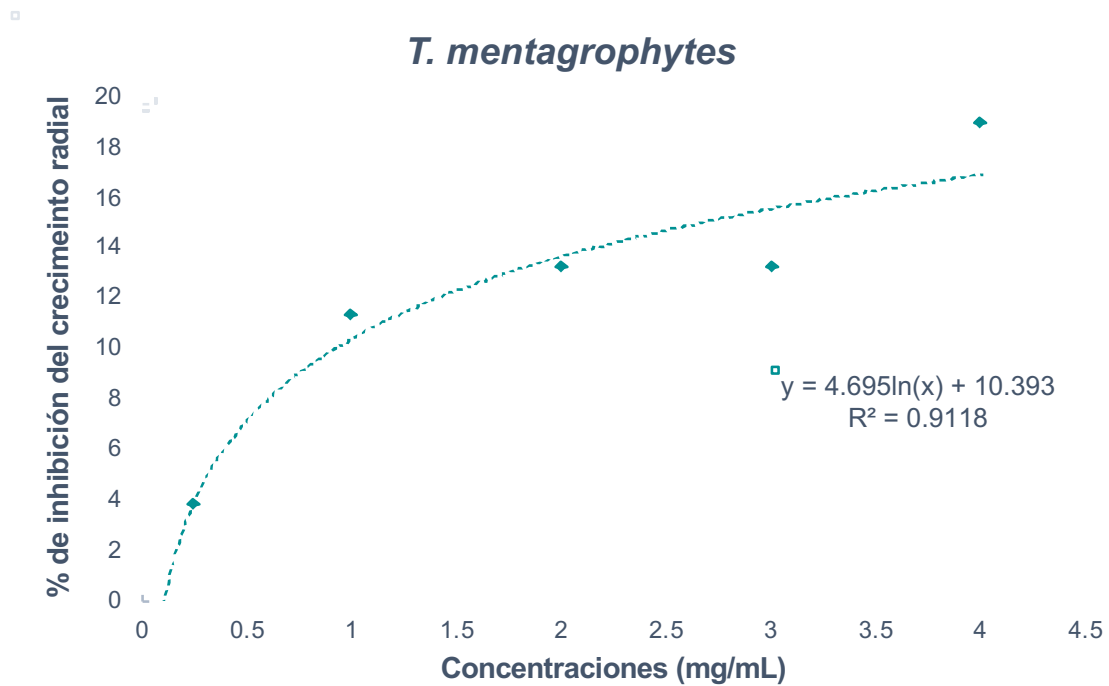


Figura 7.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *T. mentagrophytes* con las diferentes concentraciones del extracto metanólico

## DISCUSIÓN

### Rendimiento de los extractos y fitoquímica

Los resultados obtenidos de los rendimientos de los extractos de *S. ciliaris* sugieren que los compuestos de mayor polaridad son los más abundantes (metanólico 8.14%), mientras que los compuestos con polaridad media son los menos abundantes (acetato de etilo 1.06%) (Figura 1).

Las pruebas fitoquímicas de detección de MS muestran que el extracto metanólico de *S. ciliaris* presenta la mayor diversidad de MS, seguida del extracto de acetato de etilo y el hexánico (Tabla 3); esto contrasta con Saganuwan y Gulumbre (2006), quienes encontraron una mayor cantidad de MS en los extractos de mediana y baja polaridad (cloroformo y hexáno) de *S. acuta* que en el extracto de alta polaridad (metanol).

Se ha reportado que los principales componentes del género *Sida* son los alcaloides y los flavonoides, y es la efedrina (alcaloide) el posible marcador quimitaxonómico de este género (Dinda *et al.*, 2015). Para *S. ciliaris* se reporta la presencia de estos dos grupos de MS, además de taninos y saponinas, presentes también en *S. acuta*, *S. alba*, *S. cordifolia* y *S. rhombifolia* (Karou *et al.*, 2005b; Saganuwan y Gulumbre, 2006; Konaté *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2013). Finalmente de las 9 especies estudiadas hasta el momento pertenecientes al género, únicamente *S. acuta* reportó presencia de monoterpenos (Jang *et al.*, 2003) siendo *S. ciliaris* la segunda planta con presencia de estos MS.

La diferente composición de los extractos, así como su rendimiento está sujeta a diversas variables tales como: técnica de extracción, tratamiento o almacenamiento del material vegetal y condiciones geobotánicas de crecimiento (Ruiz *et al.*, 2007). Estas diferencias también pueden deberse a la parte que se utilizó para la obtención de los extractos, ya que los MS se distribuyen de diferente manera en las plantas, dependiendo de la función que desempeña, así como sus requerimientos con el

ambiente (Sepúlveda *et al.*, 2003). La edad del ejemplar interviene mucho en cuanto a la presencia o ausencia de alcaloides, ya que la presencia de este grupo de MS generalmente declina al aumentar la edad de la planta (Ghosal *et al.*, 1975).

## Evaluación de la actividad antibacteriana

Lo reportado sobre la actividad antibacteriana (Tabla 4) muestra que los tres extractos de *S. ciliaris* tienen una actividad específica sobre *K. pneumoniae*, bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa y no móvil. Esta es un patógeno humano común asociado con infecciones nosocomiales y comunitarias. Esta bacteria es la causante de diversas infecciones como neumonía, septicemia, infecciones de heridas e infecciones del tracto urinario, que en última instancia conducen a la morbilidad y la mortalidad especialmente en pacientes inmunocomprometidos y pacientes de cuidados intensivos, pediatría y salas quirúrgicas. *K. pneumoniae* adquiere resistencia contra los antimicrobianos por un mecanismo múltiple que resulta en un aumento de la resistencia a diversos fármacos, lo que ocasiona graves problemas en entornos hospitalarios (Echeverri y Cataño, 2010; Trivedi, *et. al.*, 2015).

Comparando los resultados obtenidos con lo reportado por otros autores, se tiene que extractos de diferente polaridad, así como fracciones de polifenoles extraídos de *S. acuta* no logran inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana en cuestión a concentraciones que van de 700 a 2000 µg/mL (Saganuwan y Gulumbe, 2006; Karou *et. al.*, 2005b), esta especie ha probado tener actividad sobre cepas Gram-positivas con CMI's que van de 5 a 10 mg/mL (Oboh *et. al.*, 2007), al igual que *S. cordifolia* que presenta una actividad moderada contra cepas Gram-positivas, pero ninguna contra cepas Gram-negativas (Reddy *et. al.*, 2012).

Fracciones ricas en polifenoles extraídas de *S. alba*, probaron tener un amplio espectro de acción, sobre cepas Gram-positivas y Gram-negativas; dentro de estas se encuentra *K. pneumoniae*, reportando una CMI de 50 µg/mL y una CBM de 200 µg/mL (Konaté *et. al.*, 2012) concentraciones menores a las reportadas en el presente (tabla 4), pero recordando que en *S. alba* se extrajo el principio activo hasta donde fue posible por lo cual las concentraciones son menores.

Finalmente, extractos metano-acuosos de *S. rhombifolia* igualmente probaron tener un amplio espectro de acción sobre diferentes cepas Gram-negativas, llegando a alcanzar una CMI de 50 µg/mL en *K. pneumoniae* mucho menor que la obtenida (Assam *et. al.*, 2010).

## Curvas de crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento bacteriano muestran que los tres extractos tuvieron una acción similar (Figuras 2-4), pues la CBM en los tres extractos probó tener un efecto bactericida a las pocas horas de comenzar el experimento y la concentración correspondiente a la CMI probó tener un efecto bacteriostático, en todos los extractos.

Cuando se administra un medicamento a un paciente para el tratamiento de una enfermedad, el antibiótico presenta un amplio espectro de acción, actúa sobre el germen responsable de la infección y a la vez sobre toda la flora microbiana normal. El efecto del antibiótico se traduce en la selección de cepas bacterianas resistentes que pueden ser dispersadas, este fenómeno ha llevado a las cepas causantes de infecciones adquiridas se caractericen por presentar resistencia a más de un antibiótico (Trivedi, *et al.*, 2015), tal como *K. pneumoniae*, que posee diversos mecanismos de resistencia, principalmente su disminución de la permeabilidad de la membrana externa bacteriana, lo cual explica que presente alta resistencia a los antibióticos betalactámicos, lo cual es de gran importancia porque estos son los más prescritos en todo el mundo y son bactericidas potentes (Echeverri y Cataño, 2010). Con lo anterior dicho, si se utiliza un antibiótico específico y bacteriostático, no sólo permite que el organismo genere sus propias defensas, además reduciría el efecto de resistencia bacteriana al limitarse únicamente a las bacterias causantes de la infección (Echevarría *et al.*, 2017).

Comparando estos resultados con la caracterización fitoquímica (Tabla 3), probablemente el principio activo podría encontrarse en los monoterpenos, ya que fue el grupo que tuvo presencia en los tres extractos, además de que los tres presentan un efecto similar sobre la curva de sobrevivencia de la cepa, pero, aún no se conoce con precisión cual es el grupo que tiene la bioeficacia o hay una sinergia entre ellos. En contraste, los alcaloides y flavonoides presentan los mayores principios activos en el género, ya que en especies como *S. acuta*, *S. alba*, *S. cordifolia* y *S. rhombifolia* los alcaloides, flavonoides y fenoles tienen la mayor contribución en la bioeficacia de la

planta (Jang *et al.*, 2003; Sutradhar *et al.*, 2008; Konaté *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2013); además, de que polifenoles y alcaloides extraídos de estas especies presentan la mayor actividad contra cepas bacterianas (Muanza *et al.*, 1994; Karou *et al.*, 2005a).



## ***Evaluación de la actividad antifúngica***

En este ensayo los extractos de *S. ciliaris* presentaron un efecto sobre los organismos fúngicos, inhibiendo únicamente a las cepas de hongos filamentosos (Tabla 5). Esto contrasta con lo reportado por Jindal *et al.* (2010), donde flavonoides extraídos de *S. acuta* únicamente obtuvieron actividad antifúngica significativa contra *C. albicans*. Ouedraogo *et al.* (2012), reportaron que fracciones de alcaloides extraídos de *S. cordifolia* tuvieron actividad únicamente sobre cinco cepas de *Candida*, hongos levaduriformes, en donde se reporta una  $CF_{50}$  que va de 30 a 80  $\mu\text{g/mL}$ .

Por otro lado, Mahesh y Satish (2008) reportaron una mayor actividad antifúngica del extracto metanólico de hojas que de raíces de *S. cordifolia* sobre cepas de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Prabhakar *et al.* (2007), igualmente reportaron que *S. cordifolia* presenta actividad sobre cepas de *Aspergillus* sp., aunque reportan una actividad más significativa sobre cepas levaduriformes. Comparando con estos estudios, en el presente la significativa actividad sobre cepas de hongos filamentosos y no sobre levaduriformes puede ser ocasionada por la presencia de otros tipos de MS, ya que la presencia o ausencia de estos varía por las condiciones geobiológicas (Ruiz *et al.*, 2007).

El género *Fusarium* es conocido por su capacidad de causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos con una alta mortalidad; la mayoría de las especies de este género producen toxinas que afectan a los seres vivos (Villa-Martínez *et al.*, 2015), y para este hongo el extracto hexánico probó poseer una  $CF_{50}$  baja (Figura 5).

El género *Aspergillus* es conocido como un buen productor de ácidos orgánicos, pero de igual manera, las especies de este género producen toxinas como son las aflatoxinas y las ocratoxinas (Perrone *et al.*, 2007), las cuales se manifiestan en micotoxicosis, alergias, colonizaciones saprofitas o crónicas y enfermedades invasoras o sistémicas (Denning, 2006). Muanza *et al.* (1994) reportaron que extractos de *S. rhombifolia* a concentraciones de 125 a 250  $\text{mg/mL}$  se tiene una actividad antifúngica sobre esta cepa, concentraciones muy elevadas, ya que en el

ensayo a concentraciones menores a 3 mg/mL fue evidente la actividad buscada (Figura 6).

El género *Trichophyton* tiene como reservorio principal al ser humano, en él causa tiña, onicomicosis y kerion (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2009), en este caso únicamente el extracto metanólico presentó actividad (Figura 7) inhibiendo un 20% de la población a una concentración relativamente baja comparada con lo antes reportado.

Los hongos filamentosos son de los microorganismos más estudiados ya que por las micosis profundas tienen una gran importancia médica. Actualmente se desarrollan fármacos más potentes para combatir las enfermedades y afecciones causadas por los hongos, pero estos predisponen a los organismos a una presión evolutiva (Bonifaz, 2012), por lo cual encontrar fuentes naturales de compuestos con actividad antifúngica, como lo es *S. ciliaris* es un gran aporte para continuar con esta labor, ya que en este género no se ha reportado hasta ahora dicha actividad.

## CONCLUSIONES

- *S. ciliaris* presentó actividad antibacteriana y antifúngica
- El extracto metanólico presentó el mayor rendimiento así como el mayor grupo de MS
- Los tres extractos presentaron actividad específica sobre *K. pneumoniae*
- El extracto hexánico presentó las concentraciones más bajas para ocasionar un efecto bactericida sobre *K. pneumoniae*
- El extracto con mayor actividad antimicrobiana fue el metanólico, inhibiendo a *K. pneumoniae*, *A. niger* y *T. mentagrophytes*
- **Se comprueba el uso dentro de la medicina tradicional para *S. ciliaris***

## LITERATURA CITADA

- Alonso, J. (2007). Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. *Corpus*. Argentina. 310-313 pp
- Ahmad, M., Prawez, S., Sultana, M., Raina, R., Pankaj, N.K., Verma, P.K., Rahman, S. (2014). Antihyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant potential of alcoholic extract of *Sida cordifolia* (aerial part) in streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B*. 84: 397–405.
- Assam, J.P., Dzoyem, J.P., Pieme, C.A., Penlap, V.B. (2010). *In vitro* antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 10 (40)
- Ávila, J. G. (1996). Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de maestría. FES- Cuautitlán. UNAM. México. 234 pp
- Berlin, B., Berlin, E. A., García, L., González, M., Puett, D. y Nash, R. (2001). Etnobotánica médica y desarrollo sustentable: El caso del ICBG-Maya en los altos de Chiapas. En: A. B., Rendón, D. S., Rebollar, N. J., Caballero y M. A., Martínez (Eds). *Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI*. (pp 221-258). CDMX, México.
- Bonifaz, A. (2012). Micología médica básica. Mendes Editores. México
- Brugés K. y Reguero R. M. T. (2007). Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Rev. Col. de Biotec.* 9(1): 5-13 pp
- Caballero J. y Cortés L. (2001). Percepción, uso y manejo tradicional de los recursos vegetales en México. En: A. B., Rendón, D. S., Rebollar, N. J., Caballero y M. A., Martínez (Eds). *Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación*

*entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI.* (pp 79-100). CDMX, México.

- Carmona A. J., Gil O. R., y Rodríguez A. M. C. (2008). Descripción taxonómica, morfológica y etnobotánica de 26 hierbas comunes que crecen en la ciudad de Mérida-Venezuela. *Boletín Antropológico.* (73): 113-129
- Chaves, O.S., Gomes, R.A., Tomaz, A.C.A., Fernandes, M.G., Mendes Junior, L.D.G., Agra, M.F., Braga, V.A., Souza, M.F.V. (2013). Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone. *Molecules.* 18: 2769–2777.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., y Lewis, N.G. (2000). Natural products (Secondary metabolites. En: B. Buchanan., W. Gruissem., y R. Jones R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 24: 1250-1318
- Denning, D.W. (2006). *Aspergillosis.* Schering-Plough Corporation
- Dinan, L., Bourne, P., Whiting, P. (2001). Phytoecdysteroid profiles in seeds of *Sida* spp. (Malvaceae). *Phytochem. Anal.* 12: 110–119.
- Dinda, B., Das, N., Dinda., S., Dinda., M. y SilSarma, I. (2015). The genus *Sida* L. A traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry. *J. Ethnopharmacology.* 176: 135–176
- Domínguez, X.A. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica.* Editorial Limusa. México. 39-44, 141-143, 211-228, 246 pp.
- Echevarría, G. L., Guevara, N. D., Bertona, E., De Paulis, A. N., Predari, S. C. y Benchetrit, G. (2017). Colonización por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC en un hospital universitario. *Medicina.* 77: 105-110
- Echeverri, T. L. M. y Cataño, C. J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *IATREIA.* 23 (3): 240- 249

- Ghosal, S. (1976). Abstracts of Papers, 4 Indo-Soviet Symposium on the Chemistry and Pharmacognosy of Natural Products, Central Drug Research Institute, Lucknow, India, 142 pp
- Hernández, R. A. (2001). Efecto tóxico de sustancias presentes en plantas alimenticias. En: A. B., Rendón, D. S., Rebollar, N. J., Caballero y M. A., Martínez (Eds). *Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI.* (pp 79-100). CDMX, México.
- Jang, D.S., Park, E.J., Kang, Y.P., Su, B.N., Hawthorne, M.E., Vigo, J.S., Graham, J.G., Cabieses, F., Fong, H.H.S., Mehta, R.G., Pezzuto, J.M., Douglas Kinghorn, A. (2003). Compounds obtained from *Sida acuta* with the potential to induce quinone-reductase and to inhibit 7, 12-dimethylbenz [a]-anthracene-induced preneoplastic lesions in a mouse mammary organ culture model. *Arch. Pharmacol Res.* 26: 585–590.
- Jadhav, A.N., Pawar, R.S., Avula, B., Khan, I.A. (2007). Ecdysteroid glycosides from *Sida rhombifolia* L. *Chem. Biodivers.* 4: 2225–2230.
- Jindal, A., Kumar, P., Jain, C. (2012). Antifungal activity of flavonoids of *Sida acuta* Burm f. against *Candida albicans*. *Int. J. Drug. Dev. Res.* 4: 92–96.
- Karou D., Savadogo A., Canini A., Yameogo S., Montesano C., Simpore J., Colizzi V. y Traore A. S. (2005a). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African J. Biotechnology.* 4(12): 1452- 1457 pp
- Karou, D., Dicko, M. H., Simpore, J., Traore, A. S. (2005b). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 823-828
- Koneman, E., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. (1996). *Diagnóstico microbiológico.* Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 909 p
- Konaté K., Hilou A., Mavoungou. J. F., Nicaise L. A., Souza A., Barro N., Datte J. Y, M'Batchi B., y Nacoulma O. G. (2012). Antimicrobial activity of polyphenol-rich

fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against cotrimixazol resistant bacteria strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 11: 5

- Mahesh, B., Satish, S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plants against plant and human pathogens. *World J. Agric. Sci.* 4 (S): 839–843.
- Muanza, D.N., Kim, B.W., Euler, K.L., Williams, L. (1994). Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire. *Int. J. Pharmacogn.* 32: 337–345.
- Oboh, I.E., Akerele, J.O., Obasuyi, O. (2007). Antimicrobial activity of the ethanol extract of aerial parts of *Sida acuta* Burm. f. (malvaceae). *Trop. J. Pharm. Res.* 6: 809–813.
- OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud.
- Ouedraogo, M., Konate, K., Lepengue, A.N., Souza, A., M' Batchi, B., Sawadogo, L.L. (2012). Free radical scavenging activity, anticandidal effect of bioactive compounds from *Sida cordifolia* L., in combination with nystatin and clotrimazole and their effect on specific immune response in rats. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 11 (33)
- Prabhakar, T., Nagarathna, P.K.M., Rao, T.S., Baby, B., Ramesh, K., Suresh, B. (2007). Antibacterial and antifungal activity of *Sida cordifolia* Linn. *Asian J. Chem.* 19: 4649–4652.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. y Samson R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology.* 59: 53-66
- Reddy, S.M., Kumari, C.K., Reddy, C.S., Reddy, Y.R.R., Reddy, C.D. (2012). Antimicrobial activity of leaf extracts of *Sida cordifolia*. *Int. Res. J. Pharm.* 3: 309–311.

- Rendón, A.B., Rebollar, D.S., Caballero, N. J. y Martínez, A. M. A. (Eds). (2001). Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los abores del siglo XXI. CDMX, México: UAM-I
- Ruiz, C., Tunorosa, F., Martínez, J., Staschenko, E. (2007). Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimitipos de *Lippia origanoides* H. B. K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica*. 13 (33): 325-328
- Saganuwan, A. S. y Gulumbe, M. L. (2006). Evaluation of *Sida acuta* subspecies *acuta* leaf/flower combination for antimicrobial activity and phytochemical constituents. *Afric. J. Clinical Experimental microbiology*. 7 (2): 83-88
- Sánchez-Saldaña, L., Matos-Sánchez, R, y Kunakawua, S. H. (2009). Infecciones micóticas superficiales. *Dermatología peruana*. 19 (3): 226-266
- Sarukhán J., Koleff P., Carabias J., Soberón J., Dirzo R., Llorente-Bousquets J., Halffter G., González R., March I., Mohar A., Anta S., de la Maza J. (2009). Capital Natural de México: Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectiva de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 100 pp
- Sutradhar, R.K., Matior Rahman, A.K.M., Ahmad, M.U., Saha, K. (2007). Alkaloids of *Sida cordifolia* L. *Indian J. Chem*. 46 B: 1896–1900.
- Sutradhar, R.K., Matior Rahman, A.K.M., Ahmad, M.U., Bachar, S.C. (2008). Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochem. Lett*. 1: 179–182.
- Sepúlveda-Jiménez G., Porta D. H., y Rocha S. M. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *R. Mex. Fitopatología*. 21 (3): 355-363 pp
- Trivedi, M. K., Branton, A., Trivedi, D., Shettigar, H., Gangwar, M. y Jana, S. (2015). Antibio gram typing and biochemical characterization of *Klebsiella pneumoniae* after Biofield treatment. *J. Trop Dis*. 3: 173



- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*. 64 (2): 194-205
- Wang, H. y Bun, T. N. (2002). Insolation of an Antifungal Thaumatin-like protein from kiwifruit. *Phytochemistry*. 61: 1-6

## APÉNDICES

### I. Descripción de *Sida ciliaris*

*S. ciliaris* pertenece a la familia Malvaceae. Es una hierba perenne de 10 a 30 cm de alto. Posee un tallo postrado ramificado desde la base. Estípulas filiformes, hirsutas, de 4-10 mm de largo. Pecíolos largos, cilíndricos, plano-canaliculado en la cara superior, más cortos que la lámina, de 1/2 a 1/3 la longitud de ella, alcanzando de 1 a 3 cm de largo. Lámina foliar lineal-oblonga, con la base cordada y el ápice obtuso, irregularmente dentada. Flores solitarias, axilares, con pedicelos cortos de 1.5-5 mm, articulados en el tercio superior. Corola amarilla o amarillo-salmón, con la base rojiza, pétalos anchos, obovados, asimétricos, con dos lóbulos obtusos en el ápice, uno de ellos más grande y pronunciado, margen superior ciliado, de 10 mm de largo por 8 mm de ancho. Tubo estaminal de 4 mm de largo, estrellado-pubérulo. Ovario cónico, con 10-14 carpelos. Semillas subglobosas, trígonoas. Floración durante todo el año. Se encuentra en los bordes de las carreteras, hábitats perturbados, generalmente en áreas abiertas. Se encuentra desde Texas hasta Brasil y fue introducida en ciertas regiones de Asia (Carmona, *et. al.*, 2008)



Figura 8.- *Sida ciliaris* L. Iconografía Mutisiana: 2133 Real Jardín Botánico, Madrid.

## II. Caracterización Fitoquímica por métodos colorimétricos de los extractos

(Domínguez, 1979)

Los extractos se analizan mediante las pruebas de presencia y/o ausencia de los grupos de metabolitos secundarios ordenados en la tabla 6:

Tabla 6. Pruebas cualitativas de los principales grupos de metabolitos secundarios con su respectivo reactivo y apariencia positiva.

| Grupo                    | Reactivo                                   | Apariencia positiva   |
|--------------------------|--|---|
| Alcaloides               | Mayer                                      | Precipitado lechoso   |
|                          | Dragendorf                                 | Precipitado color ladrillo  |
| Saponinas                | Agitación                                  | Produce espuma  |
| Taninos                  | Gelatina al 1%                             | Precipitados: azul negruzco (T. hidrolizables) y pardo verdoso (T. condensados) |
| Esteroides y triterpenos | Lieberman-Buchard                          | Color azul o verde: esteroides<br>Rojo, violeta-morado: triterpenos             |
| Monoterpenos             | Vainillina- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Halo azul verdoso, morado o naranja rojizo                                      |
| Cumarinas                | NaOH                                       | Coloración amarilla que al agregar HCl al 10% desaparece                        |
| Fenoles                  | Cloruro férrico                            | Color azul-verde  |
| Glicósidos               | Molish                                     | Anillo morado   |

### III. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer

(Koneman *et al.*, 1996)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos vegetales. Se utilizan discos de celulosa impregnados con concentraciones estándar de un antibiótico. Estos discos se colocan en placas de agar en las que se realizó la inoculación del microorganismo objeto de evaluación. A medida que las bacterias se multiplican durante la incubación nocturna, el antibiótico muestra difusión en el agar. Alrededor de cada disco aparece una banda de inhibición cuyo tamaño es proporcional a la susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico del que está impregnado el disco. Aplicando criterios estandarizados, se equipará el tamaño de la banda de inhibición con la resistencia o sensibilidad del microorganismo frente al antibiótico (Struthers y Westran, 2005 citado por Ávila, 2016).

El método es el siguiente:

**Medio.** Se utiliza agar Müeller-Hinton (Bioxon) ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas. El medio debe alcanzar en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino los compuestos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución de compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

**Inóculo.** Se prepara con un asa de siembra estéril, se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de microorganismos a ensayar. Se sumerge en 10 mL de caldo MH, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo del cultivo a 37°C por aproximadamente 24 h o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ML.

**Preparación del Estándar.** Se prepara añadiendo 0.5 mL de  $\text{BaCl}_2$  a 99.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.36 N (Hendrickson, 1987 citado por Ávila, 2016). La comparación de turbidez entre el

estándar y el caldo con los organismos de estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o con espectrofotómetro.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9% hasta igualarlas. Cuando lo anterior es logrado, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana y se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar MH. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente, se aconseja dejar entreabierta la tapa ya que así se permite la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Por último, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría

Aplicación de extractos. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del No. 5, previamente esterilizados. Al obtenerlos se impregnan con la cantidad deseada de extracto (2 mg de cada extracto disuelto en 10 mL del disolvente correspondiente por sensidisco).

Para la prueba de susceptibilidad se colocan los sensidiscos de manera manual sobre la superficie del agar, con ayuda de una pinza estéril, estos sensidiscos se deben colocar por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa. Se debe presionar suavemente con la punta de las pinzas, con cuidado de no moverlos.

Control positivo. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con 25 µg de cloranfenicol.

Control negativo. Se utilizan sensidiscos impregnados con cada extracto dejándose 12 h evaporando.

Una vez preparadas debidamente las cajas para las pruebas de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36°C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>, debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH.

Interpretación de resultados. Si hay zonas de inhibición el extracto se reporta como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.

#### **IV. Microtécnica de dilución en caldo**

(Koneman *et al.*, 1996)

Concentración mínima inhibitoria. Es el parámetro fundamental para determinar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibiótico. Se introduce en placas de ELISA una suspensión diluida, de modo que cada uno de los pozos tiene una concentración diferente del antibiótico que pretende ser evaluado. La concentración antibiótica máxima utilizada en esta prueba suele ser de 32 mg/mL. Tras la incubación a lo largo de la noche, se determina la CMI comprobando el crecimiento de las bacterias en cada uno de los tubos, indicado por la turbidez en su interior. La CMI es la concentración menor que inhibe el crecimiento de las bacterias (Struthers y Westran, 2005).

Concentración mínima bactericida. Se realiza con las mismas placas de la CMI. Si las bacterias sobreviven en los pozos que tienen una dilución superior al doble de la CMI, se considera que las bacterias son “tolerantes” al antibiótico (Struthers y Westran, 2005).

Solución. Se prepara una solución patrón y con base en esta se toman alícuotas correspondientes con la finalidad de obtener las concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 6.0 y 9.0 mg/mL. Una vez agregada cada concentración del extracto la mezcla se agita rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocan en los pozos de las placas.

Inóculo. Consiste en una suspensión bacteriana con una concentración de  $1.5 \times 10^8$ , bacterias/mL, de esta suspensión se toman 0.1 mL y se le adicionan a 99.9 mL de solución salina al 0.9% obteniendo una concentración de  $10^5$  bacterias/mL. Cada pozo se inocula con 50  $\mu$ L de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 h a 37° C, asad este tiempo se le añaden 50  $\mu$ L de una solución de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08% a cada pozo, se incuba por 30 min. a 37° C. En los pozos donde se desarrolla el organismo el colorante es reducido formazan que es de color rojo, produciéndose un

botón en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

Control negativo. Se usan cajas con 6 mL de caldo MH con 50  $\mu$ L del solvente empleado para disolver el problema.

Control positivo. Se utilizan cajas sin extracto con 6 mL de caldo MH.

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento bacteriano representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración en la que se produce una inhibición de la población del 99.99% representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM).



## V. Curva de sobrevivencia

(Kubo, 1993, citado por Ávila, 1996)

**Concentración.** La concentración de un antibiótico debe ser eficaz y durar el tiempo suficiente. La concentración debe ser una o varias veces superior a la CMI. Sin embargo, la concentración no tiene que ser tan elevada como para causar toxicidad en el paciente.

**Medio.** Se utiliza como medio de cultivo el agar MH. Se coloca en cajas Petri septadas.

**Inóculo.** Se prepara con aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo MH.

**Inoculación.** Con una micropipeta se inoculan 0.1 mL de la suspensión de bacteria en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL de cada uno en cada tubo. Se incuban en una estufa a  $35^\circ\text{C}$  sin presión de  $\text{CO}_2$ .

**Evaluación de compuestos.** Los extractos a evaluar se preparan en tubos con 10 mL de caldo MH con las concentraciones de CMI y CBM. Se muestrea cada hora durante los primeros cinco tiempos:  $T_0-0$ ,  $T_1-1$ ,  $T_2-2$ ,  $T_3-3$ ,  $T_4-4$  y  $T_5-5$  (Tiempo-horas transcurridas), después dos muestreos cada dos horas, luego un muestreo a las 12 horas y finalmente uno a las 24 horas. En cada tiempo se realizan dos diluciones de 50  $\mu\text{L}$  en tubos con 5 mL de solución salina para determinar las UFC en uno. Como testigo se prepara un tubo sin extracto.

Las cajas se incuban durante 24 horas a  $35^\circ\text{C}$ . Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactividad bacteriana, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

## **VI. Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar**

(Wang y Bun, 2002).

Evaluación cualitativa. Se evalúa la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos del extracto. Los compuestos difunden a través del agar y, si estos son activos, el crecimiento del hongo es más lento o se detiene, resultando la deformación de la colonia.

Agar. Se utilizan 20 mL de agar papa-dextrosa (PDA), en el cual se pone un botón con el micelio del hongo en crecimiento.

Sensidiscos. Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5 se impregnan con 2 mg del extracto disueltos en 10  $\mu$ L del solvente correspondiente. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo para dejar que el disolvente se evapore por completo. Los discos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial, utilizando una pinza estéril. Se realizan tres repeticiones para cada extracto por cepa de hongo.

Control negativo. Se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10  $\mu$ L de solvente.

Control positivo. Se usan sensidiscos con 7  $\mu$ g de ketoconazol.

En el caso de existir alguna deformación en el crecimiento del hongo, se reporta el extracto como activo ya que en condiciones normales el crecimiento del hongo es circular y éste debe crecer encima de los sensidiscos como con el control negativo, también cualquier signo de diferencia de color, esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

## **VII. Determinación de la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>)**

(Wang y Bun, 2002)

Agar y concentraciones. Se mide el efecto sobre los hongos filamentosos del extracto. Con cajas de 24 pozos se preparan con el compuesto incorporándolo en el agar a determinadas concentraciones. En cada pozo se coloca 1.5 mL de agar papa-dextrosa (PDA), con las siguientes concentraciones del compuesto a evaluar: 2, 1.5, 1, 0.75, 0.50 y 0.25 mg/mL. Posteriormente se coloca una pequeña cantidad de micelio en el centro de cada pozo, esto se realiza por triplicado.

Control negativo. Para el control negativo se le agrega al agar el mayor volumen de solvente usado en los grupos experimentales y se emplea un grupo testigo para comparar la velocidad de crecimiento.

Incubación. Las placas son incubadas a 28°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Resultados. Se mide el crecimiento del hongo y se realiza una gráfica dosis-respuesta, en la que la respuesta es el porcentaje de inhibición, tomando en cuenta que el grupo testigo es el 0% de inhibición.

La concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>).