



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Extractos de *Tecoma stans* (L.) Juss.
ex Kunth (candox) (Bignoniaceae):
actividad biológica y grupos de
metabolitos secundarios

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

GABRIELA GUILLÉN GUTIÉRREZ



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2019



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Extractos de *Tecoma stans* (L.)
Juss. ex Kunth (candox)
(Bignoniaceae): actividad biológica
y grupos de metabolitos
secundarios

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

GABRIELA GUILLÉN GUTIÉRREZ

Directora

Dra. Lorena Mercedes Luna Cazás

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2019



Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas
Dirección de Servicios Escolares
Departamento de Certificación Escolar
Autorización de impresión



Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 06 de agosto de 2019

C. Gabriela Guillén Gutiérrez

Pasante del Programa Educativo de: Licenciado en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Extractos de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (candox) (Bignoniaceae): actividad biológica

y grupos de metabolitos secundarios.

En la modalidad de Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE


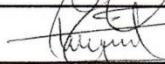
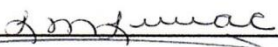
Revisores

Dra. Carolina Orantes García

Mtra. Fátima del Rosario Jiménez Sánchez

Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres

Firmas:

Ccp. Expediente

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por permitirme culminar esta importante etapa de mi vida.

A la Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres, por permitirme ser su tesista, brindándome su confianza, apoyo, comprensión, paciencia y conocimiento, haciendo posible que el presente escrito se llevara a cabo y fuera enriquecedor.

A la Dra. Carolina Orantes García, por tomarse el tiempo de realizar la revisión del documento, y por sus valiosas recomendaciones al mismo.

A la M. en C. Fátima del Rosario Jiménez Sánchez, quien con su objetividad aportó apreciadas observaciones, además de haberme impartido clases durante la carrera.

A la Mtra. Cecilia Guadalupe Hernández Tondopó por su gran apoyo en la realización de este trabajo.

Al personal del Herbario Eizi Matuda por haber corroborado la especie en estudio.

A los profesores y estudiantes del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal por brindar un ambiente de aprendizaje.

Al Instituto de Ciencias Biológicas por la formación académica impartida que me hizo posible ser una profesionista.

DEDICATORIAS

A mi familia, por confiar en mí, por su apoyo y amor invaluable, son lo mejor; mi mamá (María), mi papá (Rafael), mis abuelitas (Tita y Nati), mi abuelito (Manuel), mis hermanas (Alejandra y Araceli), mis sobrinas (Natalie y Ximena) y mis perritos (Bambi y Maki), los quiero inmensamente, no sé qué haría sin ellos.

A Julián, por ser un extraordinario amigo y compañero, apoyándome en lo que fuera posible, alentándome a siempre seguir.

A Erika, amiga y compañera de la carrera, así como de laboratorio, por haber vivido juntas esta odisea... ¡Qué buenos momentos!.

A mis queridos amigos, Valentina, Miguel y Rubiel por su apoyo, cariño y por creer en mí.

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Género <i>Tecoma</i>	3
2.2. La especie en estudio: <i>Tecoma stans</i> (candox)	3
2.2.1. Ubicación taxonómica y sinonimias	4
2.2.2. Descripción botánica	5
2.2.3. Nombres vernáculos y étnicos	7
2.2.4. Empleo medicinal	8
2.2.5. Metabolitos secundarios identificados	9
2.3. Bacterias ensayadas	10
2.3.1. Gramnegativas	10
2.3.1.1. <i>Escherichia coli</i> y sus patotipos	12
2.3.1.2. <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhi (<i>Salmonella</i> Typhi)	22
2.3.1.3. <i>Shigella sonnei</i>	24
2.3.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.3.2. Grampositivas	29
2.3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.3.2.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	33
2.3.2.3. <i>Bacillus subtilis</i>	35
2.3.2.4. <i>Streptococcus pyogenes</i>	36
2.4. Metabolitos secundarios de las plantas	39
2.4.1. Metabolitos secundarios nitrogenados: alcaloides	41
2.4.2. Metabolitos secundarios que no contienen nitrógeno	43
2.4.2.1. Fenoles	43
2.4.2.2. Glucósidos	52
2.4.2.3. Terpenos-Esteroides	56
2.5. El crustáceo <i>Artemia salina</i>	63
2.5.1. Generalidades	63

2.5.2. Ubicación taxonómica.....	64
2.5.3. Ciclo de vida	65
III. ANTECEDENTES	66
IV. OBJETIVOS	72
4.1. General	72
4.2. Particulares.....	72
V. ZONA DE RECOLECTA	73
VI. MÉTODO.....	75
6.1. Recolecta de las muestras vegetales.....	75
6.2. Obtención de los extractos.....	75
6.3. Ensayos antibacterianos	76
6.3.1. Bacterias.....	76
6.3.2. Preparación del inóculo	77
6.3.3. Concentraciones de prueba.....	77
6.3.4. Prueba de difusión en agar	78
6.3.5. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	79
6.3.6. Concentración Bactericida Mínima (CBM)	81
6.4. Identificación de grupos de MS	83
6.5. Toxicidad de los extractos sobre <i>Artemia salina</i>	85
6.6. Análisis estadístico de los resultados.....	87
VII. RESULTADOS	88
7.1. Registro del material vegetal.....	88
7.2. Rendimiento de los extractos	88
7.3. Concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de los extractos más activos.....	100
7.4. Grupos de metabolitos secundarios	102
7.5. Toxicidad de los extractos.....	106
VIII. DISCUSIÓN.....	108
IX. CONCLUSIONES	115
X. LITERATURA CITADA	115
XI. ANEXOS.....	138

Anexo 1. Rendimiento de los extractos de <i>T. stans</i>	138
Anexo 2. Efecto inhibitorio de los extractos de hojas de <i>T. stans</i>	139
Anexo 3. Efecto inhibitorio de los extractos de cortezas de tallos de <i>T. stans</i>	140
Anexo 4. Efecto inhibitorio de los extractos de cortezas de <i>T. stans</i>	141
Anexo 5. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de hojas	142
Anexo 6. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de cortezas de tallos	144
Anexo 7. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de cortezas	145
Anexo 8. Efecto de cada extracto sobre las bacterias ensayadas	147
Anexo 9. Valores de CIM de los extractos obtenidos de cortezas de tallos y cortezas.....	152
Anexo 10. Resultados de la prueba con el reactivo de Dragendorff para identificar alcaloides.	153
Anexo 11. Resultados de la prueba de cloruro férrico para identificar fenoles.	154
Anexo 12. Resultados de la prueba para taninos hidrolizables y condensados.....	155
Anexo 13. Resultados de la prueba de Shinoda para identificar flavonoides.....	156
Anexo 14. Resultados de la prueba de Molish para identificar glucósidos.....	157
Anexo 15. Resultados de la prueba de espuma para identificar saponinas.....	158
Anexo 16. Resultados de la prueba de Liebermann-Buchard para identificar terpenos-esteroides.....	159
Anexo 17. Resultados de la prueba de Baljet para identificar lactonas sesquiterpénicas.	160
Anexo 18. Concentraciones letales medias de los extractos de <i>T. stans</i> con <i>Artemia salina</i>	161
Anexo 19. Valores de la CL ₅₀ de cada extracto.	161

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sinonimias de <i>T. stans</i>	5
Cuadro 2. Géneros de <i>Enterobacteriaceae</i> aislados con mayor frecuencia.	12
Cuadro 3. Compuestos fenólicos producidos por plantas.....	45
Cuadro 4. Principales tipos de flavonoides.....	50
Cuadro 5. Clasificación de CL ₅₀	86
Cuadro 6. Efecto de las estructuras de <i>T. stans</i> sobre las bacterias ensayadas	99
Cuadro 7. Efecto CIM y CBM de los extractos de cortezas de tallos y cortezas	100
Cuadro 8. Grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos de candox.....	102

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Preparación de los extractos.....	76
Diagrama 2. Preparación del inóculo bacteriano.	77
Diagrama 3. Método de difusión en placas de agar.	79
Diagrama 4. Prueba para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM)	81
Diagrama 5. Prueba para determinar la concentración bactericida mínima (CBM).....	82
Diagrama 6. Pruebas para la determinación de grupos de metabolitos secundarios.....	85
Diagrama 7. Prueba de actividad biológica sobre <i>A. salina</i>	87

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>T. stans</i>	88
Gráfica 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas.	89
Gráfica 3. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas	91
Gráfica 4. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de cortezas de tallos	93

Gráfica 5. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de cortezas de tallos.....	95
Gráfica 6. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de cortezas	96
Gráfica 7. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de cortezas.	97
Gráfica 8. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en los extractos de hojas	103
Gráfica 9. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en los extractos de cortezas de tallos	104
Gráfica 10. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en los extractos de cortezas	105
Gráfica 11. Inhibición bacteriana y MS identificados en los extractos.....	106
Gráfica 12. Toxicidad de los extractos de <i>T. stans</i>	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Tecoma stans</i> (L.) Juss. ex Kunth	7
Figura 2. Esquema de la pared bacteriana Gramnegativa	11
Figura 3. Esquema de la pared bacteriana Grampositiva.....	30
Figura 4. Estructura química de quinina y quinidina.	43
Figura 5. Estructura química del fenol	43
Figura 6. Estructura química del lapachol	45
Figura 7. Estructura química de los taninos	47
Figura 8. Estructura básica de los flavonoides	49
Figura 9. Estructura de la digitonina	53
Figura 10. Estructura química de las saponinas.....	55
Figura 11. Estructura química de monoterpenos.....	58
Figura 12. Estructura del capsidiol	59
Figura 13. Estructura química del núcleo kaurano	60
Figura 14. Estructura química del ácido lántico	60
Figura 15. Estructura del millerenólido	62
Figura 16. Larva de <i>Artemia salina</i> vista al microscopio óptico	63

Figura 17. Localización de la zona de recolecta.....	73
Figura 18. Distribución de los discos en la caja Petri.....	78
Figura 19. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico de hojas de cadox.....	90
Figura 20. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de hojas sobre Grampositivas.	91
Figura 21. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de hojas sobre Gramnegativas	92
Figura 22. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico de cortezas de tallos de cadox	94
Figura 23. Zonas de inhibición producidas por el extracto metanólico de cortezas de tallos de cadox	95
Figura 24. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico de cortezas sobre <i>S. aureus</i>	96
Figura 25. Zonas de inhibición producidas por el extracto metanólico de cortezas.....	98
Figura 26. CIM de los extractos de <i>T. stans</i> sobre <i>S. aureus</i>	101
Figura 27. CIM del extracto metanólico de cortezas sobre EIEC.....	101
Figura 28. CIM del extracto metanólico de cortezas sobre <i>S. aureus</i>	102

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar las propiedades antibacterianas, así como identificar los grupos de metabolitos secundarios y la toxicidad generada por los extractos etanólicos y metanólicos de hojas, cortezas de tallos y cortezas deshidratados de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, las cuales fueron recolectadas en una etapa en que la planta carecía de flores y frutos. Se llevaron a cabo pruebas de difusión en agar sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas, siendo las últimas más susceptibles a los extractos y, en general, *Staphylococcus aureus* fue la cepa que resultó ser inhibida por todos los extractos probados, cabe mencionar que las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Streptococcus pyogenes*, fueron totalmente resistentes a estos extractos. Se evaluó la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) y CBM (Concentración Bactericida Mínima) solo a las bacterias inhibidas con zonas sin crecimiento mayores a 10 mm, los extractos de cortezas de tallos etanólico y metanólico fueron bactericidas (CIM y CBM= 0.625 y 0.3125 mg/mL respectivamente) frente a *S. aureus*, al igual que el metanólico de cortezas (0.625 mg/mL) contra EIEC, mientras que este último extracto fue bacteriostático con *S. aureus* (CIM= 0.3125 mg/mL). Se identificaron: fenoles, taninos de tipo condensado, glucósidos, lactonas sesquiterpénicas y saponinas, variando en presencia y cantidad en las diferentes estructuras evaluadas; el extracto metanólico de hojas presentó cuatro de estos grupos, mismo que inhibió a 11 de 13 cepas bacterianas. La toxicidad evaluada con la prueba de *Artemia salina*, indicó que los extractos etanólico y metanólico de cortezas no son tóxicos (CL₅₀ 2 127.34 y 3 987.23 µg/mL respectivamente), a diferencia de los de hojas y cortezas de tallos que sí lo son. Se demuestra que los dos extractos de cortezas de *T. stans* son no tóxicos, factor de gran interés, ya que poseen propiedades antimicrobianas a diferentes concentraciones, por lo que se sugiere ampliar los estudios en este aspecto. Se corrobora, en las condiciones en que se realizó este trabajo, la capacidad del candox de inhibir a bacterias que producen infecciones.

I. INTRODUCCIÓN

En México, las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como suburbano, cuando los servicios de atención médica son escasos, acentuándose en las poblaciones más alejadas de las cabeceras municipales y de los centros urbanos (Osuna-Torres *et al.*, 2005).

En el país, los terapeutas tradicionales (especialistas de la medicina tradicional) representan la única alternativa médica para más de 40 millones de mexicanos que no tienen acceso a los diferentes centros de salud. En cuanto a los conocimientos de la medicina tradicional, existen profundas raíces prehispánicas en las diferentes regiones del país ya que el uso de las plantas es una costumbre milenaria que continúa proporcionando salud y bienestar, por lo que es importante estudiarlas científicamente, y también rescatar el conocimiento ancestral (Osuna-Torres *et al.*, 2005; Hurtado-Rico *et al.*, 2006).

Las plantas medicinales son ampliamente utilizadas, y ahora se sabe que son fuente importante de principios activos con efecto farmacológico. Aunque gran parte de los medicamentos se obtienen por síntesis química, la mayoría de las estructuras principales están basadas en productos naturales. Mundialmente existe un 44% de nuevos medicamentos basados en productos naturales y en países desarrollados el 25% de los medicamentos son derivados de plantas (Pérez-Alonso y Jiménez, 2001).

En México alrededor de 4 000 especies de plantas con flores (aproximadamente el 15% de la flora total) poseen atributos medicinales, por lo que cerca de una de cada siete especies tiene alguna propiedad curativa. Los principios activos se deben precisamente a los compuestos químicos de algunas plantas que las hacen útiles como medicamento, y pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras. Su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad, entre otros (Ocegueda *et al.*, 2005).

Los principios activos de las plantas son también conocidos como metabolitos secundarios (MS), muchos son utilizados a nivel farmacéutico para producir

medicamentos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2010). Sin embargo, es necesario aplicar el método científico de manera interdisciplinaria para el estudio de las plantas que actualmente están siendo utilizadas como medicinales, es decir, que se aborden aspectos fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, entre otros (Osuna-Torres *et al.*, 2005).

En diferentes publicaciones se indica el empleo de las plantas para tratar enfermedades tanto de tipo infeccioso como crónico degenerativas (Chávez *et al.*, 2017; Gallegos-Zurita, 2016; Rodríguez, 2012). En México, uno de los principales problemas de salud pública que destaca son las enfermedades gastrointestinales, se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil, y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes. Los agentes patógenos involucrados son bacterias, parásitos y virus. Las infecciones causadas por bacterias son las más comunes ya que éstas pueden colonizar prácticamente cualquier lugar del cuerpo de los humanos y/o animales (Hernández-Cortez *et al.*, 2011).

Entre las plantas utilizadas no sólo en Chiapas sino en otros lugares de México se encuentra *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, especie conocida como candox y utilizada desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas las de tipo gastrointestinal y las referentes a la piel (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2018), sin embargo, a pesar del amplio uso de esta planta y de los diversos estudios antimicrobianos realizados a esta, solo en uno de ellos se indica la época de recolecta, por lo que es importante saber este dato, para tener un mejor conocimiento acerca de la composición fitoquímica de la planta, del efecto sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas causantes de infecciones así como de la toxicidad de los extractos provenientes de diversas estructuras botánicas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Género *Tecoma* Juss.

La familia Bignoniaceae Juss. incluye especies leñosas, raramente herbáceas con porte sarmentosa (Pavone, s/f). Tiene una distribución geográfica en su mayoría pantropical, aunque se pueden encontrar algunas especies en zonas templadas, sin embargo, su centro de diversidad es América tropical (Castillo y Rossini, 2010; Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares, 2017). Incluye cerca de 120 géneros con 1 000 especies en el mundo, 27 géneros y 80 especies en México (Martínez y Ramos, 2012).

Las plantas de muchas especies de esta familia tienen importancia económica debido a su uso ornamental, maderable y como materia prima para la elaboración de medicinas, fibras y tinturas (López-Alzate y Salazar-Yepes, 2017).

El nombre del género *Tecoma* deriva de la palabra náhuatl “tecomaxochitl” que significa flor en forma de copa, aunque los antiguos mexicanos también la conocían como “nixtamaxochitl”, el epíteto específico *stans* proviene del latín *sto*, -are, -steti, -statum, erguido, por su porte (Sánchez de Lorenzo-Cáceres, 2015; Ramírez, 2017). Se conocen alrededor de una docena de especies, que se distribuyen desde el extremo sur de Arizona y sur de Florida, a través de América tropical, hasta el norte de Argentina, especialmente diversificadas en Los Andes (Jardín Botánico de Madrid, s/f). El género tiene 10 especies, una con tres variedades en México (Martínez y Ramos, 2012).

2.2. La especie en estudio: *Tecoma stans* (candox)

Es originaria de México y actualmente se localiza desde la parte sur de Florida, Texas y Arizona (Estados Unidos), a través de todo México y Centroamérica, llegando al norte de Venezuela y a lo largo de los Andes hasta el norte de Argentina. Se distribuye ampliamente por toda la República Mexicana (CONABIO, 2018).

Es endémica del continente americano, aunque es una especie invasora en diversas regiones de África. Es la flor oficial de las Islas Vírgenes y un símbolo de las Bahamas (Gallardo-Alba, 2019).

Habita en las selvas bajas y medianas subcaducifolias, preferentemente en vegetación secundaria (Secretaría de Desarrollo y Medio Ambiente [SEDUMA], 2012). Se encuentra en áreas abiertas y soleadas así como en la vegetación secundaria, es frecuente encontrarla a orilla de caminos y de carreteras o sobre paredones (Zamora, 2011). Su distribución altitudinal varía de 0 a 2 000 msnm en lugares con precipitaciones de 600 a 2 000 mm, pero crece bien en sitios secos con suelos pobres pero bien drenados y es intolerante a las heladas (Salazar y Soihet, 2001). Se presenta en climas cálido, semicálido, seco, muy seco y templado (Olivas, 1999).

La floración ocurre durante los meses de julio a agosto en México y Nicaragua, de noviembre a mayo en El Salvador y durante todo el año en Costa Rica y Puerto Rico. La polinización es realizada por abejas melíferas (Salazar y Soihet, 2001). Los frutos han sido observados en febrero y marzo (Zamora, 2011).

Es una especie muy utilizada como ornamental en parques y jardines; en la medicina tradicional las hojas, la raíz y la corteza son usadas para controlar la diabetes (SEDUMA, 2012).

2.2.1. Ubicación taxonómica y sinonimias (Guerra-Centeno *et al.*, 2016)

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Orden: Lamiales

Familia: Bignoniaceae Juss.

Género: *Tecoma* Juss.

Especie: *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth

En la base de datos de Trópicos.org (2018), esta especie cuenta con diversas sinonimias que se anotan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Sinonimias de *T. stans*.

<i>Bignonia frutescens</i> Mill.	<i>Stenolobium stans</i> var. <i>pinnata</i> Seem.
<i>Bignonia incisa</i> hort. ex A. DC.	<i>Stenolobium stans</i> var. <i>pinnatum</i> Seem.
<i>Bignonia sorbifolia</i> Salisb.	<i>Stenolobium tronadora</i> Loes.
<i>Bignonia stans</i> L.	<i>Tecoma fabrisii</i> T. Mey.
<i>Bignonia tecoma</i> Wehmer	<i>Tecoma incisa</i> (Rose & Standl.) I.M. Johnst.
<i>Bignonia tecomoides</i> A. DC.	<i>Tecoma incisa</i> Sweet
<i>Gelsemium molle</i> (Kunth) Kuntze	<i>Tecoma molle</i> Kunth
<i>Gelsemium mollis</i> (Kunth) Kunth	<i>Tecoma mollis</i> Kunth
<i>Gelsemium stans</i> (L.) Kuntze	<i>Tecoma sorbifolia</i> Kunth
<i>Stenolobium incisum</i> Rose & Standl.	<i>Tecoma stans</i> var. <i>angustata</i> Rehder
<i>Stenolobium molle</i> (Kunth) Seem.	<i>Tecoma stans</i> var. <i>apiifolia</i> hort. ex DC.
<i>Stenolobium quinquejugum</i> Loes.	<i>Tecoma stans</i> var. <i>mollis</i> (Kunth) Siddiqi
<i>Stenolobium stans</i> (L.) Seem.	<i>Tecoma stans</i> var. <i>velutina</i> DC.
<i>Stenolobium stans</i> var. <i>apiifolium</i> (hort. ex DC.) Seem.	<i>Tecoma tronadora</i> (Loes.) I.M. Johnst.
<i>Stenolobium stans</i> var. <i>multijugum</i> R. E. Fr.	<i>Tecoma velutina</i> Lindl.

2.2.2. Descripción botánica

Arbustos o árboles bajos (figura 1A), ca. 3.0 m alto, 20.0 cm diámetro. Tronco con corteza costillada (figura 1B), ramas teretiformes, pardas, lepidotas e irregularmente

puberulentas. Hojas imparipinnadas; pecíolos 1.0-9.0 cm largo o ausentes, pecíolulos ca. 2.0 mm largo o ausentes, 3-9-folioladas, las ramas jóvenes a veces con hojas simples o 1-folioladas, folíolos opuestos, lanceolados, base cuneada, ápice agudo, dentados o serrados, folíolo terminal 2.0-15.0 cm largo, 1.0-6.0 cm ancho, los laterales más largos hacia el extremo distal, con frecuencia atenuados, ambas superficies esparcidamente lepidotas, con tricomas simples en la nervadura principal, nervaduras secundarias frecuentemente pubérulas en la base, a veces toda la superficie pubérula (figura 1C).

Inflorescencias terminales o subterminales, en racimos, hasta 20 flores, pocas flores abren al mismo tiempo; eje principal y pedicelos lepidotos. Flores amarillas; cáliz 3.0- 7.0 mm, largo, 3.0-4.0 mm ancho, cupular, alargado, 5-dentado, dientes ca. 1.0 mm largo, ligeramente lepidoto, ciliado, con glándulas submarginales, conspicuas, hundidas; corola 3.5-5.8 cm largo, 1.2-2.4 cm ancho en la boca; tubular campanulada, base estrecha, ca. 1.0 cm largo, dilatándose distalmente, lóbulos 1.0-1.6 cm largo, amarilla con 7 líneas rojizas en la garganta, 2 líneas rojas inconspicuas en la base de los lóbulos superiores, glabra por fuera, pero glandular, glabra por dentro, excepto por los tricomas glandulares al nivel de la inserción estaminal, con tricomas torcidos en los senos y en los pliegues de la garganta, estambres insertos a 8.0-9.0 cm de la base del tubo, filamentos 1.5-2.4 cm largo, tecas 3.5 mm largo, divaricadas, pubescentes, con tricomas torcidos simples, multicelulares, estaminodio 4.0-5.0 mm largo; disco nectarífero cupular pulviniforme, ca. 1.0 mm largo, ca. 1.0 mm ancho; gineceo 3.1- 3.4 cm largo, ovario 3.0 mm largo, ca. 1.0 mm ancho, angostamente cilíndrico, glandular-lepidoto, óvulos 2 series por lóculo (figura 1D).

Cápsulas 7.0-21.0 cm largo, 5.0-7.0 mm ancho, lineares, ahusada hacia los extremos, teretiformes cuando inmaduros, superficie lenticelada, casi glabra a ligeramente lepidota; semillas 3.0-5.0 mm largo, 2.4-2.7 cm ancho, alas hialino-membranosas (figura 1E) (Martínez y Ramos, 2012).



Figura 1. *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. A) Aspecto general; B) Corteza; C) Hojas; D) Inflorescencia; E) Inflorescencia con frutos.

2.2.3. Nombres vernáculos y étnicos

El nombre vernáculo que recibe en algunos lugares de México, sauco amarillo, se debe al parecido de las hojas con las del sauco del género *Sambucus* o al color y forma de sus flores (Sánchez de Lorenzo-Cáceres, 2015). La revisión de la literatura permitió sumar 58 nombres vernáculos, los cuales se apuntan a continuación: candox (Chiapas); tronador, tronadora, sauco amarillo, lluvia de oro, corneta, campanas amarillas, palo de arco (Rep. Mexicana); borla de San Pedro, hierba de San Pedro (San Luis Potosí); corneta amarilla (Durango); flor de San Pedro (México, S.L.P.); trompeta, hierba de San Nicolás, hoja de baño (Guerrero); miñona (Nuevo León) (CONABIO, 2018); roble, copal, gloria (Sinaloa); trompeta (Oaxaca); histoncle, estoncle (Morelos); pichiten, retama (México); mazorca, caballito, San Pedro, pichiche (Olivas, 1999), alacrancillo, ángel, canario, escandor, hierba de baño, iscandor, moco de cócono, ojo de Santa Lucía, sanguinaria, trueno, trueno frente (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana [BDMTM], 2009a).

Al ser la distribución geográfica de esta especie muy amplia, también los nombres comunes lo son: bignonia amarilla, lapachillo, guarán amarillo (Argentina); árbol canario (Bolivia); sauco amarillo (Cuba y Puerto Rico); cholán (Ecuador); San Andrés (El Salvador, Guatemala); sardinillo (Nicaragua); copete (Panamá); amarelinho, carobinha, Ipê de jardín, Ipê amarelo de jardín (Brasil); carboncillo y

vainillo (Costa Rica); fresnillo (Venezuela); chicalá (Colombia); yellow bells, yellow elder (inglés) (Hermida, 2007).

También es conocida con distintos nombres étnicos en diversos estados de México, en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, recibe el nombre de candox, que pudiera significar lengua (totz) de tigre (kan) en zoque (Miranda, 2015), a continuación se mencionan 19 de estos nombres con los que se le conoce en otros lugares de México:

Batilimi, matilimi, (Chiapas), x-cantul, xk'anlol, xkantol, x'kanlol (maya, Yucatán); guiabiche, guie-bacaná, guie-bichi (zapoteco, Oaxaca); ichcuatl, mixtontze, ixontli (Puebla); lipa-gundoflei (chontal, Oaxaca); k'aptzarukua (purhépecha, Michoacán); nixtamalxochitl (náhuatl), xochimitl (Puebla); yucuc (mixteco, Guerrero); huiztonxochitl, izotontli (náhuatl, Morelos) (Olivas, 1999; BDMTM, 2009a; CONABIO, 2018).

2.2.4. Empleo medicinal

De esta planta se reportan 54 usos medicinales distintos y 56 componentes químicos (Ramírez, 2017), por lo que tiene un amplio uso en la herbolaria de México y América Central principalmente para trastornos diabéticos, urinarios y digestivos (Anburaj *et al.*, 2016; Dewangan *et al.*, 2017; Kumar, 2017). Asimismo, se emplea en la República Mexicana para tratar diferentes padecimientos de tipo digestivo como dolor de estómago, disentería, gastritis, mala digestión, empacho, pirosis (reflujo gastroesofágico), atonía intestinal y problemas del hígado. Para tratar el empacho se recomienda hacer una infusión a la cual se le añade rosa de castilla y viuxita (spp. n/r), y contra la disentería sólo se le añade tapacola (*Waltheria americana* L.) (BDMTM, 2009a).

A continuación se anotan algunas de las propiedades farmacológicas atribuidas a las estructuras botánicas de la planta, y más utilizadas en la herbolaria, posiblemente gracias al contenido de moléculas químicas biológicamente activas.

Las hojas son utilizadas por su actividad antimicrobiana, antidiabética, antiespasmódica y para el control de trastornos urinarios (Navaneethan *et al.*, 2016),

además se ha demostrado su actividad antifúngica y antitumoral (Kumar y Patel, 2010; Patriota *et al.*, 2016).

Las flores y la corteza son utilizadas para tratar varios tipos de cáncer. Estas flores contienen beta caroteno y zeaxanteno para tratar trastornos oculares, también como antiproliferativo, cicatrizante y citotóxico (Anburaj *et al.*, 2016).

Además, el cocimiento de la corteza y las flores, en forma de bebida, se ha utilizado para tratar el dolor de estómago (Gibaja, 1998).

Las raíces son usadas por su actividad diurética y vermífuga (Navaneethan *et al.*, 2016; Anburaj *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2012).

Se reporta que las semillas, raíces y cortezas son las partes más importantes para el uso medicinal, ya que poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antidiabéticas, antiespasmódicas, e incluso anticancerígena (Anburaj *et al.*, 2016; Kumar, 2017).

También se le atribuyen actividades farmacológicas, tales como vermífuga, tónica (Namde y Wani, 2014; Kumar, 2017), antihiperlipidémica (Anburaj *et al.*, 2016), antihelmíntica, antiamebiana, útil para aliviar la gastritis, empachos, disentería, enteritis aguda, diarrea, úlceras estomacales, problemas del hígado, contribuye a disminuir la fiebre, el dengue, el asma y la tos; también ha sido aplicada a problemas ginecológicos así como a casos de sífilis (CONABIO, 2018).

2.2.5. Metabolitos secundarios identificados

T. stans posee diversos compuestos activos tales como flavonoides, alcaloides, esteroides, saponinas, quininas, taninos, fitoesteroles, monoterpenos, triterpenos, fenoles y glucósidos (Anburaj *et al.*, 2016; Kumar, 2017), de éstos, los alcaloides, triterpenos y compuestos fenólicos han sido identificados en toda la planta.

Las hojas contienen muchos productos químicos biológicamente activos, como varios tipos de alcaloides entre ellos los derivados terpénicos como los monoterpenos: actidina, boschniakina, tecomarina, tecostatina y tecostidina, esteroides, taninos, fitosteroles, los componentes benzílicos: ácidos cafeíco,

paracumárico, ferúlico, y el flavonoide ácido siríngico (Dewangan *et al.*, 2017; Ramírez, 2017). En las flores se han identificado dos flavonoides, el glucósido, y el rutinósido, de cianidín (Ramírez, 2017). Del extracto etanólico de los frutos se aislaron los alcaloides monoterpénicos 7-hidroxi-skitantina, 4-hidroxi-tecomanina; junto con 5-hidroxi-skitantina y tecomanina (Ospina y Pinzón, 1995).

Las evaluaciones fitoquímicas de raíces han revelado la presencia de alcaloides, flavonoides, glucósidos, esteroides, taninos y triterpenoides (Thakur *et al.*, 2012).

2.3. Bacterias ensayadas

2.3.1. Gramnegativas

Estas bacterias se caracterizan por tener la pared celular compuesta por una capa de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. El periplasma contiene una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte. La pared celular de estas bacterias no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que contenga una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica (Tortora *et al.*, 2007).

La membrana externa de las bacterias Gramnegativas está compuesta por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos. La intensa carga negativa dificulta considerablemente la fagocitosis y la actividad del complemento como la lisis de las células e inducción de la fagocitosis, dos componentes de las defensas del huésped. La membrana externa también constituye una barrera que impide el paso de ciertos antibióticos, de enzimas digestivas, de detergentes, de metales pesados, de sales biliares y de ciertos colorantes (Tortora *et al.*, 2007; Montoya, 2008) (figura 2).

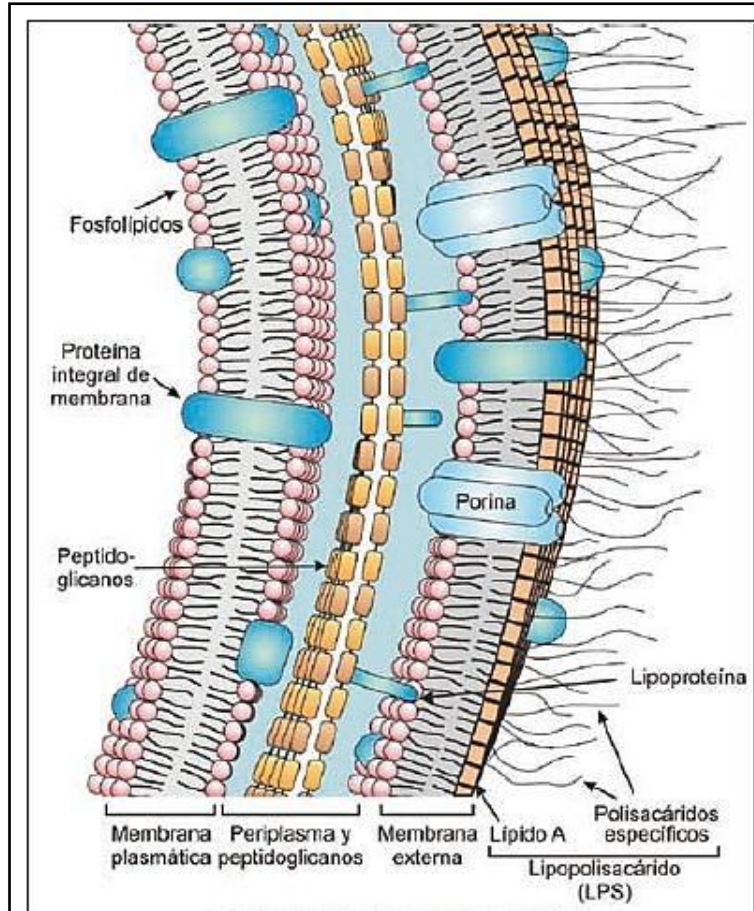


Figura 2. Esquema de la pared bacteriana Gramnegativa. Fuente: Lizarbe-Iracheta, 2009.

Sin embargo, para sustentar el metabolismo, la membrana externa es permeable y esto se debe en parte a la presencia de proteínas llamadas porinas, las que forman canales de membrana. Estas permiten el paso de diversas moléculas, como nucleótidos, disacáridos, péptidos, aminoácidos, vitamina B₁₂ y hierro (*Ídem*).

El componente LPS de la membrana externa es responsable de dos características importantes de estas bacterias, en primer lugar, la fracción polisacárida está compuesta por azúcares llamados polisacáridos O que actúan como antígenos y son útiles para diferenciar las distintas especies de este tipo de bacterias. En segundo lugar, la porción lipídica del lipopolisacárido, denominada lípido A, se conoce con el nombre de endotoxina y ejerce un efecto tóxico sobre la circulación sanguínea o el aparato digestivo del huésped (*Ídem*).

Los organismos Gramnegativos se dividen en diferentes grupos como son: enterobacterias (bacilos), bacilos no fermentadores, oxidasa positivos y fermentadores de lactosa, exigentes y cocos (Lopardo *et al.*, s/f).

La familia *Enterobacteriaceae* es un extenso y heterogéneo grupo de bacterias Gramnegativas. Su nombre se debe a la localización habitual como saprófitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010; Universidad de Buenos Aires, s/f). Esta familia incluye 41 géneros pero ocho son los más aislados clínicamente (cuadro 2).

Cuadro 2. Géneros de *Enterobacteriaceae* aislados con mayor frecuencia.

Localización	Enterobacterias más frecuentes
Sistema nervioso central	<i>Escherichia</i>
Tracto respiratorio inferior	<i>Klebsiella, Enterobacter, Escherichia</i>
Torrente sanguíneo	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter</i>
Tracto digestivo	<i>Salmonella, Shigella, Escherichia, Yersinia</i>
Tracto urinario	<i>Escherichia, Proteus, Klebsiella, Morganella</i>

2.3.1.1. *Escherichia coli* y sus patotipos

Bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, del género *Escherichia*, es anaerobia facultativa principal de la flora microbiana que reside en el colon humano; se describió por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich. Fue nombrada inicialmente como "*Bacterium coli commune*", pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor (Romeu-Álvarez, 2012). Este microorganismo es un habitante normal del intestino grueso de los vertebrados, incluidos los seres humanos, y su presencia es beneficiosa porque ayuda a producir ciertas vitaminas y degradar comestibles que de otro modo no podrían digerirse (Tortora *et al.*, 2007).

Es un bacilo que mide entre 1.1-1.5 µm de diámetro por 2.0-6.0 µm de largo, se disponen aislados o en parejas, son aerobios y anaerobios facultativos, por lo que

poseen metabolismo respiratorio y fermentativo, no forman esporas, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles (Faleiro-Naves, 2010; Rípodas *et al.*, 2017). Son mesófilos, ya que pueden crecer a temperaturas entre 7°C y 50°C, teniendo un crecimiento óptimo a 37°C. El pH óptimo es 7 (neutro), aunque el interno se mantiene en un valor muy cercano a 7.6 siendo el valor óptimo para su metabolismo. Al igual que la mayoría de las demás bacterias, pueden realizar reacciones metabólicas vitales sólo dentro de un intervalo de pH limitado, porque muchas de sus enzimas funcionan adecuadamente sólo en un intervalo estrecho del mismo (Garzón-Ruiz y Gómez-Guerrero, 2007; Rípodas *et al.*, 2017).

Son oxidasa negativo y forman ácidos y gas a partir de la mayor parte de los hidratos de carbono fermentables (Rípodas *et al.*, 2017), catalasa positivo, rojo de metilo positivo, Voges-Proskauer negativo, usualmente citrato negativo, producción de indol positivo (Leiva-Guzmán, 2006), ureasa y sulfuro de hidrógeno negativo (Paiva de Sousa, 2006) y normalmente reducen nitrato a nitrito (Faleiro-Naves, 2010). La mayoría de las cepas de *E. coli* también pueden fermentar D-manitol, D-sorbitol, L-arabinosa, maltosa, D-xilosa, trealosa y D-manosa (Rodríguez-Ángeles, 2002; Paiva de Sousa, 2006).

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez-Ángeles, 2002), por ejemplo la cepa denominada *E. coli* O157:H7 causa diarrea sanguinolenta cuando se desarrolla en el intestino. Esta cepa se reconoció por primera vez en 1982 y desde entonces se ha convertido en un problema de salud pública, siendo una de las principales causas de diarrea en todo el mundo (Tortora *et al.*, 2007).

Paralelamente, también puede causar infecciones extraintestinales tales como infecciones urinarias (IU), colecistitis, peritonitis, meningitis y sepsis (Quintero-Zarate *et al.*, 2012). Actualmente se clasifican seis grupos de *E. coli* productoras de diarrea con base a sus mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC),

enteroagregativa (EAEC), enterohemorrágica también conocida como verotoxigénica o productoras de toxina Shiga (EHEC/VTEC/STEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Ángeles, 2002), pero, en este apartado solo se describirán las utilizadas en los ensayos antibacterianos.

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

Esta cepa fue la primera que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. La presencia de un plásmido de 50-70 megadaltons (MDa) denominado EAF (*E. coli* adherence factor, en español factor de adherencia) posee la información genética codificada que mediante pilis o fimbrias BFP (bundle-forming pilus, en español pelos formadores de penachos) promueven el proceso de adherencia íntima entre las bacterias y las membranas de las células del epitelio intestinal, el cual produce la destrucción de las microvellosidades de los enterocitos (lesión en pedestal o copa), con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de la proteína cinasa C, proceso denominado adherencia y esfacelamiento o eliminación (A/E). Estos cambios bioquímicos promueven la salida de electrolitos y agua al espacio intraluminal, produciendo así diarrea aguda (Rodríguez-Ángeles, 2002; Vidal, 2003; Vidal *et al.*, 2007; Chávez-Bravo *et al.*, 2012).

De manera distintiva, todas las cepas de EPEC contienen una isla de patogenicidad denominada LEE (locus of enterocyte effacement, en español locus de esfacelamiento del enterocito) en el cromosoma bacteriano, mientras que sólo los aislamientos más virulentos codifican al plásmido EAF (Vidal *et al.*, 2007). Debido a estas características genotípicas las cepas de EPEC se dividen en típicas y atípicas, siendo las primeras las que presentan el plásmido EAF, mientras que las segundas carecen de este. La caracterización de las cepas atípicas ha cobrado importancia debido a que su aislamiento ha aumentado no sólo en niños asintomáticos sino también en niños con diarrea durante brotes epidémicos de diarrea (Varela *et al.*, 2007; Farfán-García *et al.*, 2016).

Por lo antes anotado se puede decir que la patogénesis de EPEC es esencialmente no invasiva y no secreta al medio extracelular la toxina Shiga como lo hacen otros virotipos. La enfermedad producida por EPEC es generalmente el resultado del crecimiento de esta bacteria en el intestino delgado, en un periodo de incubación de 3 a 24 horas (Vidal, 2003; Farfán-García *et al.*, 2016).

La enfermedad se transmite de manera fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos y es particularmente importante en países con climas tropicales y subdesarrollados (Rodríguez-Ángeles, 2002; Romero-Cabello, 2007) afectando principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años, aunque también puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes (Rodríguez-Ángeles, 2002), causa una diarrea acuosa que puede contener moco, pero por lo general no presenta sangre en ella. Asimismo se asocian vómito, fiebre, malestar general y deshidratación. Los síntomas pueden durar un breve periodo de varios días, aunque se han detectado casos crónicos (Paiva de Sousa, 2006).

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Las cepas de ETEC son una causa importante de diarrea secretora en los seres humanos y animales, además se relacionan con dos tipos de síndromes: diarrea en niños menores de cinco años y la diarrea del viajero. Producen enterotoxinas proteicas que son termolábiles (LT) y/o termoestables al calor (STa y STb) las que también causan diarrea. Las LT se desnaturalizan a 60°C durante 30 minutos y las termoestables (STs) pueden tolerar 100°C durante 30 minutos sin perder su actividad (Paiva de Sousa, 2006; Rojas, 2008).

ETEC se adhiere a los enterocitos para posteriormente multiplicarse, evadir la respuesta del hospedador y causar daño para poder transmitirse a otros hospedadores. Para ello, colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens, en español antígenos del factor de colonización), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas LT y ST. Estas toxinas aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP

respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones (cloro y sodio) a la luz intestinal, disminuyendo la absorción en las vellosidades, dando paso a una diarrea acuosa (Pumarola *et al.*, 1997; Rodríguez-Ángeles, 2002; Rojas, 2008; Chávez-Bravo *et al.*, 2012).

Uno de los principales factores de virulencia de este patógeno es la enterotoxina termolábil (LT), que curiosamente comparte similitud estructural y funcional con la de *Vibrio cholerae* (toxina del cólera). Aparte de LT, muchas cepas de ETEC también expresan enterotoxinas estables al calor (ST), que también contribuyen a la diarrea acuosa. Hay dos ST estructuralmente distintas, STa y STb. Las STs son pequeños polipéptidos que comparten las características comunes de calor estabilidad y múltiple enlaces disulfuro intramoleculares (Paiva de Sousa, 2006). La STa es soluble en metanol y resistente a proteasas, y STb es insoluble en metanol y sensible a proteasas; sólo la toxina STa ha sido asociada a enfermedad humana. STa es un péptido de aproximadamente 2-kDa que está formado por 18 a 19 aminoácidos (aa) (18 aa STp o STIa de porcinos, bovinos y humanos, y 19 aa STh o STIb sólo humanos), seis de los cuales son cisteínas y forman tres puentes disulfuro. Por otra parte la toxina STb se asocia con enfermedad en animales y corresponde a un péptido de 48 aminoácidos con dos puentes disulfuro (Rojas, 2008).

La enfermedad se transmite principalmente por agua y alimentos contaminados, y en ocasiones las manos también tienden a ser vías de transmisión, sobre todo para los recién nacidos, tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave ya que puede variar desde uno a cinco días, o extenderse hasta 21 días (Llop *et al.*, 2001; Rodríguez-Ángeles, 2002).

Este grupo diarrogénico aislado es importante en lactantes, debido a la frecuencia de aislamientos que va del 10 al 30%, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida, mientras que

en adultos la presencia llega a ser asintomática o de menor frecuencia (Rodríguez-Ángeles, 2002; Chávez-Bravo *et al.*, 2012).

Se estima que ETEC causa 600 millones de casos de diarrea humana y 800 000 muertes en todo el mundo, principalmente en niños menores de cinco años. Las enfermedades diarreicas por ETEC son económicamente importantes en animales como terneros recién nacidos, cerdos y corderos (Paiva de Sousa, 2006).

***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)**

Las cepas de EIEC son bioquímicamente muy similares a *Shigella*, por lo general se detectan en los cultivos en el medio de agar-hierro Kligler como colonias que no fermentan lactosa o lo hacen tardíamente, son lisina descarboxilasa negativa e inmóviles y se confirman mediante sondas de ADN o por PCR para genes asociados a la virulencia, es uno de los patotipos más difíciles de diagnosticar (Llop *et al.*, 2001; Rodríguez-Ángeles, 2002; Paiva de Sousa, 2006; Romero-Cabello, 2007; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

El mecanismo patogénico de EIEC es la invasión del epitelio del colon, para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Rodríguez-Ángeles, 2002). Su patogenicidad depende de la presencia de un gran plásmido de 140 MDa denominado pInv, el cual porta los genes de invasividad, que codifican la producción de varias proteínas de la membrana externa, como por ejemplo las Ipa, que son las efectoras del fenotipo de invasión. Estos microorganismos también parecen producir un segundo factor de virulencia que comparte con *Shigella*, una toxina parecida a la de Shiga (Romero-Cabello, 2007).

Estas cepas se evidencian con rareza en los países desarrollados (Pumarola *et al.*, 1997) y se asocian más con brotes que con casos aislados, puesto que la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua

contaminada; afectando en mayor número a escolares, adolescentes y adultos, raramente a lactantes (Rodríguez-Ángeles, 2002; Romero-Cabello, 2007).

Clínicamente se manifiestan como un cuadro similar a la disentería bacteriana, causando una incidencia elevada de fiebre, diarrea sanguinolenta acompañada de moco, cólicos y tenesmo (Llop *et al.*, 2001; Rodríguez-Ángeles, 2002; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010), además de una colitis invasiva inflamatoria (Romeu-Álvarez, 2012).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

Debe su nombre a la capacidad para agregarse en el cultivo en medio celular (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010), ya que se adhieren a las células HEp-2 con un patrón autoagregativo (Llop *et al.*, 2001; Paiva de Sousa, 2006), se consideran productoras de enterotoxinas y engloba a cepas patogénicas y no patogénicas (Romero-Cabello, 2007).

El fenotipo de adherencia agregativa (AA), se caracteriza por la autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, esta adherencia a las células HEp-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se asocia a la presencia de fimbrias o adhesinas flexibles llamadas fimbrias I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa. Además se ha descrito un segundo tipo de fimbria denominado AAF/II morfológica y genéticamente diferente a AAF/I y que está codificada por el gen *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias, más bien son una minoría de ellas (Llop *et al.*, 2001; Rodríguez-Ángeles, 2002; Romero-Cabello, 2007).

Por otra parte, algunos estudios han demostrado que ciertas cepas tienen un efecto citotóxico relacionado con genes codificados por un plásmido de 65 MDa (Llop *et al.*, 2001; Romero-Cabello, 2007), que produce la proteína Pet (plasmid encoded toxin, en español toxina codificada en plásmidos) encargada del efecto citopático en las células HEp-2, que consiste en el arredondamiento y desprendimiento de las células, seguido de la contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina (Rodríguez-Ángeles, 2002). También se ha observado la producción de mucinasa

denominada *Pic* cuyo gen tiene la capacidad de expresar en su cadena de ADN no codificante a un gen más pequeño que codifica una enterotoxina (*Shigella* enterotoxin [ShET1]) que fue descrita primeramente en las cepas de *Shigella* (Paiva de Sousa, 2006).

El sitio blanco de daño de EAEC no ha sido definido, pero se ha considerado que es la mucosa del intestino grueso y delgado (Rodríguez-Ángeles, 2002), y apuntando a un sitio más específico, el íleon es el más factible (Romero-Cabello, 2007).

Se adhiere al epitelio del intestino delgado y grueso incrementando la secreción de moco que atrapa a las bacterias en una película (Rodríguez-Ángeles, 2002; Romeu-Álvarez, 2012). La infección suele acompañarse por efectos citopáticos sobre la mucosa intestinal, acortamiento de las vellosidades, necrosis en las puntas vellosas, una respuesta inflamatoria moderada con edema e infiltración mononuclear de la submucosa (Llop *et al.*, 2001; Romero-Cabello, 2007).

Diversos estudios han relacionado casos de diarreas agudas y crónicas en los países en vías de desarrollo y de diarrea aguda en países desarrollados (Romero-Cabello, 2007; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010). Un gran número de los reportes corresponden a casos esporádicos en áreas endémicas, pero cada vez son más frecuentes los brotes y en algunos casos señalan una diarrea persistente en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Paiva de Sousa, 2006; Romero-Cabello, 2007; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

El periodo de incubación de esta bacteria puede ser de menos de ocho horas y la diarrea puede durar hasta 18 o 20 días. Por lo general se manifiesta en una diarrea acuosa mucoide, sin sangre, sin o con poca fiebre y en escasas ocasiones se presenta el vómito (Llop *et al.*, 2001), en niños se puede presentar diarrea líquida de color verde, con moco, sin sangre, y que en algunos casos puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa (Rodríguez-Ángeles, 2002).

***Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC)**

El término STEC abarca un grupo amplio de patógenos que son responsables de infecciones y enfermedades gastrointestinales graves tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica (CH) (Rípodas *et al.*, 2017). Esta cepa posee una amplia variedad de serotipos, alrededor de 400 (Blanco *et al.*, 2004) pero el más frecuente y virulento es el O157:H7, seguido del O26:H11 (Blanco, 2011).

El principal factor de virulencia de esta bacteria es la toxina de Shiga (Stx), también conocida como verotoxina (VT) (Oliveros, 2013), por lo que en algunos casos se denomina *E. coli* productora de toxina de Shiga (STEC) (Tortora *et al.*, 2007), o bien puede recibir el nombre de *E. coli* productora de verotoxinas (VTEC) (Llop *et al.*, 2001).

El grupo de cepas EHEC/VTEC/STEC producen toxinas codificadas por bacteriófagos muy similares a la producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Se han descrito dos tipos: la toxina Shiga 1 (Stx1) o verotoxina (VT1) y la toxina Shiga 2 (Stx2) o verotoxina 2 (VT2) (Rípodas *et al.*, 2017). Además se han establecido tres subtipos de Stx1 y siete de Stx2 (Blanco, 2011).

Estas toxinas son proteínas multiméricas compuestas por dos polipéptidos, un pentámero de adhesión formado por cinco subunidades B y una subunidad A (fracción enzimáticamente activa) que se fija al receptor gracias a la subunidad B, las Stx se incorporan mediante un mecanismo de endocitosis a las células blanco, las cuales pueden ser endoteliales, epiteliales y hematíes que presentan en su membrana el grupo glicolipídico P1 (Rivero *et al.*, 2004).

Las cepas STEC pueden tener factores de virulencia adicionales, destaca la intimina (proteína de membrana externa) responsable de la adhesión de las bacterias al epitelio del intestino. Dicha proteína está codificada en el gen *eae* que es parte de la isla de patogenicidad cromosómica denominada en español locus de esfacelamiento del enterocito (LEE) (Locus for Enterocyte Effacement). La intimina, se encarga de la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal y de la lesión de A/E,

que causa la destrucción de microvellosidades, y da paso a que la bacteria adherida estimule la acumulación y polimerización de actina en la célula huésped resultando en la formación de un pedestal (Rodríguez-Ángeles, 2002; Rivero *et al.*, 2004; Blanco, 2011; Oliveros, 2013; Rípodas *et al.*, 2017). Cabe mencionar que el gen *eae* está presente en las cepas de algunos de los serotipos más virulentos: O157:H7, O26:H11, O103:H2 (Rípodas *et al.*, 2017).

Por otra parte, también se ha señalado la presencia de grandes plásmidos enterohemorrágicos (megaplásmido o Mp) que se encuentran en la mayoría de las cepas productoras de colitis hemorrágica (CH) y del síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos (Rivero *et al.*, 2004), estos Mp producen hemolisinas, las cuales pueden ser: la hemolisina alfa y la hemolisina beta o enterohemolisina, esta última es la que se vincula a la producción de citotoxinas (Llop *et al.*, 2001). En aquellas cepas que carecen de LEE se ha encontrado el gen *saa* en el Mp, que puede ser el responsable de la adherencia en las cepas que no producen intimina (Rivero *et al.*, 2004).

Otro factor de patogenicidad es el plásmido de virulencia O157, que tiene un tamaño de 92 a 104 kilopares de bases (kb) el cual implica varios elementos genéticos móviles como transposones, profagos, secuencias de inserción y partes de otros plásmidos (Oliveros, 2013). Este plásmido de 60 MDa tiene el gen *ehxA* que codifica para la enterohemolisina (Rodríguez-Ángeles, 2002; Rípodas *et al.*, 2017).

Con lo expuesto anteriormente el grupo EHEC/STEC puede clasificarse de dos formas: i) en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: a) cepas típicas cuando presentan el fago, el plásmido de 60 MDa y el mecanismo de A/E, y b) cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa. ii) La otra clasificación es en función del serotipo: a) cepas *E. coli* O157:H7/STEC O157 la cual no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y CH; y b) cepas no-O157:H7/STEC no-O157 cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7, pueden ser sorbitol positivo y se conocen más de 200 serotipos (Rodríguez-Ángeles, 2002; Hunt, 2010; Rípodas *et al.*, 2017).

Además, es un importante patógeno zoonótico (Blanco, 2011), ya que el principal reservorio de este microorganismo es el tracto intestinal del ganado bovino (Oliveros, 2013), especialmente animales jóvenes (Blanco *et al.*, 2004), también se han encontrado en aves, corderos y cerdos (Llop *et al.*, 2001), las heces de estos constituyen una fuente de infección tanto para niños como para adultos (Rivero *et al.*, 2004).

Por lo general la transmisión de STEC a los humanos tiene lugar a través del consumo de melones, salchichas (Oliveros, 2013), carne molida cruda o poco cocida, de verduras y hortalizas como la lechuga, rábanos, brotes o espinacas, agua, leche o zumos sin previa pasteurización (Hunt, 2010; Rípodas *et al.*, 2017), sin embargo, la diseminación puede ser de persona a persona, cuando una de estas se encuentra eliminando estas bacterias (Rivero *et al.*, 2004) y se estima que basta con 100 células o menos de esta para que la enfermedad se desarrolle (Hunt, 2010; Oliveros, 2013).

El periodo de incubación es de uno a ocho días (Rodríguez-Ángeles, 2002) con un promedio de tres a cuatro (Oliveros, 2013), con diarrea que dura de dos a 14 días, donde los cuadros clínicos que se presentan en los seres humanos pueden ser diferentes, desde diarrea leve sin sangre, aparición repentina de calambres abdominales, náuseas, vómitos, y generalmente poca o ninguna fiebre, desarrollar colitis hemorrágica (CH), pudiendo progresar a síndrome urémico hemolítico (SUH), acompañado de anemia hemolítica, trombocitopenia, fallo renal agudo y grave, necrosis, perforación intestinal y desórdenes neurológicos que se presentan en el 2.7% de los casos (Rivero *et al.*, 2004; Hunt, 2010; Romeu-Álvarez, 2012; Oliveros, 2013; Rípodas *et al.*, 2017).

2.3.1.2. *Salmonella enterica* serotipo Typhi (*Salmonella* Typhi)

Las especies del género *Salmonella* de la familia *Enterobacteriaceae* son resistentes a la congelación y la deshidratación pero son termosensibles y se destruyen fácilmente por temperaturas de pasteurización (Ramírez-Cuenca, 2005). Actualmente se considera que el género *Salmonella* está integrado por una sola especie, *Salmonella enterica*, de la cual se han descrito más de 2 300 serotipos (Llop *et al.*,

2001; Jurado *et al.*, 2010) y *Salmonella enterica* serotipo Typhi es el serotipo de *Salmonella* más conocido (Romero-Cabello, 2007). Esta es endémica de los países en vías de desarrollo como África, América Central y del Sur, y el subcontinente de India (Threlfall y Ward, 2001).

Los microorganismos de este serotipo son bacilos Gramnegativos, por lo general miden de 0.7–1.5 µm de ancho 2–5 µm de largo, crecen de 7 a 48°C y a un pH de 4.05-9.5 con un crecimiento óptimo a 37°C y 6.5-7.5 respectivamente (Ellermeier y Slauch, 2006), no esporulados, móviles por flagelos peritricos, catalasa positiva, oxidasa negativa (Ramírez-Cuenca, 2005), en el medio Klieger no fermentan lactosa pero sí la glucosa, no producen gas, no forman desaminasas ni ureasas (Pumarola *et al.*, 1997). En agar *Salmonella-Shigella* las colonias de *Salmonella* suelen ser traslúcidas u ocasionalmente opacas, con el centro de color negro a causa de la producción de ácido sulfhídrico (Pachón-Cubillos, 2009).

Este serotipo es causante de la fiebre tifoidea, siendo la enfermedad más grave producida por cualquier miembro del género (Tortora *et al.*, 2007). El único reservorio es el hombre (Jurado *et al.*, 2010; Gil-Fortuño *et al.*, 2013) y posee antígenos somáticos (O) y flagelares (H), pero además, presenta el antígeno capsular Vi, termolábil que se relaciona con la virulencia de estas cepas, pues les da cierta protección frente a la acidez gástrica y sustancias bactericidas (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001).

La patogenicidad de *Salmonella* está relacionada con varios locus cromosomales. En *S. enterica* se han identificado cinco islas y varios islotes de patogenicidad, pero el mejor estudiado es el SPI-1, que se encarga de codificar los genes que permiten invadir a células no fagocíticas SPI-1, gracias a los 31 genes que codifican los componentes del sistema III secretor (Inv/Spa). Además posee un segundo sistema secretor tipo III (Spi/Ssa), codificado en la isla de patogenicidad SPI-2, y difiere del primer sistema en cuanto a organización genética, distribución filogenética y función, puesto que Spi/Ssa causa enfermedad sistémica y las mutantes que carecen de él tienen mitigada su capacidad para producir esta forma de la enfermedad (Llop *et al.*, 2001).

En países en desarrollo, la infección es más común en individuos entre cinco y 25 años de edad, principalmente en niños escolares. En países industrializados, la mayoría de los casos reportados ocurren en individuos mayores de 19 años (Romero-Cabello, 2007). La vía de transmisión es la fecal-oral, sea por contacto con heces humanas o bien a través de aguas contaminadas, productos animales y vegetales para consumo humano que han tenido contacto con heces humanas, alimentos manipulados por portadores (Llop *et al.*, 2001; Jurado *et al.*, 2010) y también puede ocurrir de manera trasplacentaria al momento del parto (Romero-Cabello, 2007).

El periodo de incubación ocurre entre dos y tres semanas, el desarrollo de la enfermedad va a depender en gran medida de la cantidad de microorganismos ingeridos (inóculo), de su virulencia y de factores dependientes del huésped (Jurado *et al.*, 2010). Los síntomas son malestar general, fiebre persistente, cefalea, diarrea o estreñimiento, tos, náuseas, vómitos, dolor abdominal, escalofríos, y pueden presentarse exantema y bradicardia relativa (Jurado *et al.*, 2010; Gil-Fortuño *et al.*, 2013).

2.3.1.3. *Shigella sonnei*

El género *Shigella* de la familia *Enterobacteriaceae* está integrado por bacilos cortos Gramnegativos sin agrupación que miden de 0.7 μm x 3 μm (Molina y Uribarren, 2011), inmóviles, anaerobios facultativos, no esporulados, oxidasa negativa, catalasa positiva, no fermentan la lactosa rápidamente, no producen desaminasas, no fermentan el mucato, no hidrolizan la urea, en el medio de agar hierro-Kligler no se observa la producción de H_2S , son lisina negativa, crecen a una temperatura que varía entre 10-45°C, crecen a un pH de 6 a 8 y no sobreviven al pH inferior a 4.5, estas cepas son sensibles al calor y mueren por calentamiento mayor a los 70°C (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001; Ramírez-Cuenca, 2005).

Se reconocen cuatro especies patógenas de *Shigella*: *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. boydii*. Estos microorganismos sólo son residentes del tubo digestivo de los seres humanos, y están estrechamente relacionadas con *E. coli*

patógena (Tortora *et al.*, 2007) debido a que su ADN alcanza una similitud de hasta 70-75% (Molina y Uribarren, 2011).

Los genes que posee *Shigella* para determinar su virulencia son tanto de carácter plasmídico como cromosomal. Los genes cromosomales se pueden agrupar en dos categorías: los que regulan la expresión de virulencia en el plásmido y los genes que interfieren en la sobrevivencia bacteriana en el intestino y en los tejidos infectados, por ejemplo aquellos que codifican para el lipopolisacárido celular y los sideróforos (Llop *et al.*, 2001).

S. sonnei se caracteriza por fermentar el manitol, no producir gas a partir de la glucosa, ser indol negativo (Llop *et al.*, 2001), además, pocas cepas de esta bacteria pueden fermentar lentamente la lactosa (2%) y la sacarosa (1%); y la mayoría de las cepas pueden descarboxilar ornitina, característica no compartida por otras especies de *Shigella* (Pumarola *et al.*, 1997; Winn *et al.*, 2008). Por lo general forman colonias redondas de 2 mm, convexas y transparentes (Arredondo García y Villicaña Cortina, 2007).

Desde el punto de vista antigénico constituye un grupo homogéneo, que incluye un serotipo. Las cepas recién aisladas y virulentas forman colonias lisas (colonias de forma I), que en los cultivos se disocian dando lugar a colonias rugosas, lo cual señala la pérdida de su virulencia y la fracción más externa del lipopolisacárido de la pared celular (colonias de forma II) (Pumarola *et al.*, 1997).

Los bacilos disentéricos poseen un antígeno O, lipopolisacárido termoestable, constituido por uno o varios factores antigénicos responsables de la especificidad y pueden o no presentar el antígeno K, el cual es termolábil y es responsable de la O-inglutinabilidad (Pumarola *et al.*, 1997; Molina y Uribarren, 2011).

En todas las cepas virulentas de *S. sonnei* se ha detectado la presencia de un plásmido de 120-140 MDa, que codifica factores o antígenos superficiales (probablemente proteínas de la membrana externa) directamente relacionados con la capacidad de penetración en las células epiteliales (Pumarola *et al.*, 1997).

Estas cepas son las responsables de la enfermedad denominada disentería bacilar o shigelosis, la cual se contrae con una dosis infectante muy pequeña (10^1 - 10^2), ya que no son muy afectadas por la acidez gástrica (Pumarola *et al.*, 1997; Tortora *et al.*, 2007). El hombre es tanto reservorio como hospedero natural de *Shigella* (Llop *et al.*, 2001). *S. sonnei* tiene una evolución clínica breve y una tasa de letalidad casi insignificante, excepto en los huéspedes inmunodeficientes (León-Ramírez, 2002), por lo que el cuadro varía ampliamente de las condiciones del huésped (Pumarola *et al.*, 1997).

El periodo de incubación es de 12 horas a 4 días. Clínicamente se manifiesta por una infección asintomática o una diarrea leve hasta cuadros de diarrea acuosa con fiebre, cólicos abdominales, tenesmo y evacuaciones con sangre, moco, pus (disentería bacilar) y náusea con o sin vómito, donde las deposiciones aumentan hasta a 20 diarias, y generalmente cede espontáneamente a los 4-8 días (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001; Tortora *et al.*, 2007; Molina y Uribarren, 2011).

En los países desarrollados se transmite principalmente vía fecal-oral, por contacto directo de persona a persona, mientras que en los países en vías de desarrollo suele darse también por contacto indirecto (manos sucias, alimentos y objetos recientemente contaminados), además de que las moscas contribuyen de manera importante en la transmisión (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001). La shigelosis es endémica en los climas tropicales y templados, y en países en vías de desarrollo como México. *Shigella sonnei* es la especie más común en los países industrializados (77%) (Hernández-Cortez *et al.*, 2011).

2.3.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

La familia *Pseudomonadaceae* está constituida por una gran variedad de especies que son de vida libre, habitan en el suelo y las aguas estancadas, se encuentran en materiales orgánicos en descomposición y tienen un importante papel en la degradación de este (Llop *et al.*, 2001). La familia está conformada por cocos y bacilos Gramnegativos aerobios, siendo una mezcla compleja de patógenos oportunistas de animales y plantas. Incluye los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Fraxinaria* y *Zoogloea* (García del Valle y Zamudio-Durán, 1998).

Pseudomonas aeruginosa es la especie tipo del género, fue originalmente descubierta por Schroeter en 1872 (Ruíz, 2007; Slabbinck *et al.*, 2010). Es un bacilo alargado Gramnegativo aerobio estricto, no fermentador de los hidratos de carbono, provisto de un flagelo polar que le confiere movilidad, y de pilis que le permiten adherirse a las superficies. Crece fácilmente en los medios de cultivo ordinarios como agar sangre donde forma colonias planas, de olor dulce y aromático a uvas, y color azul-verdoso debido a la producción de pigmentos, piocianina y pioverdina (Pumarola *et al.*, 1997; Mallolas y Vila, 2002), además presentan hemólisis (Ruíz, 2007).

En agar MacConkey las colonias de *P. aeruginosa* son redondas e incoloras debido a que no fermentan la lactosa, es oxidasa positiva, no producen gas ni sulfuro de hidrógeno, son Kligler alcalino y pueden crecer a 42 °C con formación de velo en medio líquido, lo cual es un dato importante puesto que otras especies del mismo género son incapaces de crecer a esta temperatura (Llop *et al.*, 2001; Callicó, 2004). Aunque se clasifica como aerobio estricto, algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación o mediante la fermentación de compuestos como la arginina o el piruvato (Ruíz, 2007).

P. aeruginosa es reconocida como una fuente común de infecciones nosocomiales, siendo así uno de los patógenos oportunistas más importantes en el medio hospitalario (Callicó, 2004) y, clínicamente causa problemas de bacterimia (sepsis), neumonía, endocarditis, osteomielitis, otitis, artritis, meningitis, absceso cerebral, infecciones urinarias, infecciones de la piel y partes blandas, infecciones oftálmicas, infecciones otorrinolaringológicas, infecciones del tubo digestivo (Mallolas y Vila, 2002), y es particularmente importante en pacientes con quemaduras severas y fibrosis quística (Ruíz, 2007).

Cabe mencionar que no es frecuente encontrar a este como parte de la flora bacteriana de individuos sanos, pero en caso de ser así, el tracto gastrointestinal es el lugar más frecuente de colonización, además la faringe, la mucosa nasal y zonas como las axilas o el perineo, son otros lugares de donde ha sido aislada en un 2-10% de individuos sanos (*Ídem*).

Posee una resistencia natural, la cual se debe principalmente a la presencia de una membrana externa poco permeable, a una β -lactamasa AmpC inducible y a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos que producen lo que se denomina resistencia mediada a la permeabilidad (impermeability mediated resistance) (Ruíz, 2007). Se distinguen tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y mucoide (M) (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001).

Los factores de colonización incluyen las fimbrias, que se encuentran en todas las cepas, y una capa mucosa que se localiza en la superficie de la pared y que contribuye al anclaje de la bacteria en las células de los tejidos (Romero-Cabello, 2007; Ruíz, 2007).

La patogénesis de este microorganismo se describe como multifactorial, debido a que la virulencia no se puede atribuir a un único determinante. Entre estos se incluyen adhesinas, exotoxinas, proteasas, hemolisinas, y el sistema de secreción de tipo III (Ruíz, 2007). Considerando el efecto de los factores de patogenicidad, se pueden agrupar en tres tipos: los de colonización, la endotoxina de pared y las sustancias extracelulares (Romero-Cabello, 2007)

La endotoxina de pared, que como en otros bacilos Gramnegativos, es un lipopolisacárido que causa necrosis focal en el sitio de colonización (Romero-Cabello, 2007), modula la función de los neutrófilos, obstaculiza la inducción de anticuerpos y es inmunogénico (Llop *et al.*, 2001).

Las sustancias extracelulares incluyen: dos hemolisinas, una es un glucolípido y la otra una fosfolipasa (fosfolipasa C), la primera es termoestable mientras que la segunda es termolábil; ambas destruyen en conjunto a los lípidos y la lecitina (Llop *et al.*, 2001; Mallolas y Vila, 2002). También se reconocen dos proteasas, una de ellas es la exotoxina A, que es un polipéptido que está formado por una fracción A y una fracción B, donde esta última se fija a las células receptoras y la A como proenzima, se activa e inhibe la síntesis de las proteínas por inactivación de factor de elongación. El principal órgano blanco de esta exotoxina es el hígado y además produce necrosis celular (Pumarola *et al.*, 1997; Romero-Cabello, 2007).

La otra proteasa es una elastasa que destruye la lámina elástica de los vasos sanguíneos, con producción de hemorragia y necrosis (Mallolas y Vila, 2002). Cabe mencionar que en algunas cepas se ha identificado otra exotoxina denominada exotoxina S, que inhibe la síntesis proteica, produce daños en las células epiteliales con el objetivo de facilitar la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis, sin embargo el mecanismo no está bien aclarado (Romero-Cabello, 2007; Ruíz, 2007).

En algunas cepas se ha encontrado una enterotoxina que podría explicar la diarrea que se presenta en pacientes en quienes se aísla esta cepa, predominantemente en las evacuaciones líquidas (Romero-Cabello, 2007).

El sistema de secreción de tipo III, es el mayor determinante de virulencia, es común en muchos patógenos Gramnegativos, y su función es la de transportar toxinas directamente desde la bacteria adherida a la célula eucariota. Este sistema transporta cuatro toxinas (ExoS, ExoT, ExoU, y ExoY) implicadas en la inhibición de la fagocitosis, la promoción de destrucción tisular y el retardo de la curación de heridas (Ruíz, 2007).

2.3.2. Grampositivas

En la mayoría de las bacterias Grampositivas la pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida. Además, contiene ácidos teicoicos que están compuestos principalmente por un alcohol (por ej., glicerol o ribitol) y fosfato. Existen dos clases de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico, que abarca toda la capa de peptidoglucano y está unido a la membrana plasmática, y el ácido teicoico mural, que está unido a la capa de peptidoglucano (figura 3). La carga negativa de los ácidos teicoicos (generada por los grupos fosfato) determina que estos compuesto se unan a los cationes y regulen su movimiento hacia el interior y el exterior de las células. Estos ácidos también pueden contribuir al desarrollo celular al prevenir la ruptura de la pared celular y reducir el riesgo de lisis. Por último los ácidos teicoicos son responsables de una gran parte de la especificidad antigénica de la pared celular (Tortora *et al.*, 2007).

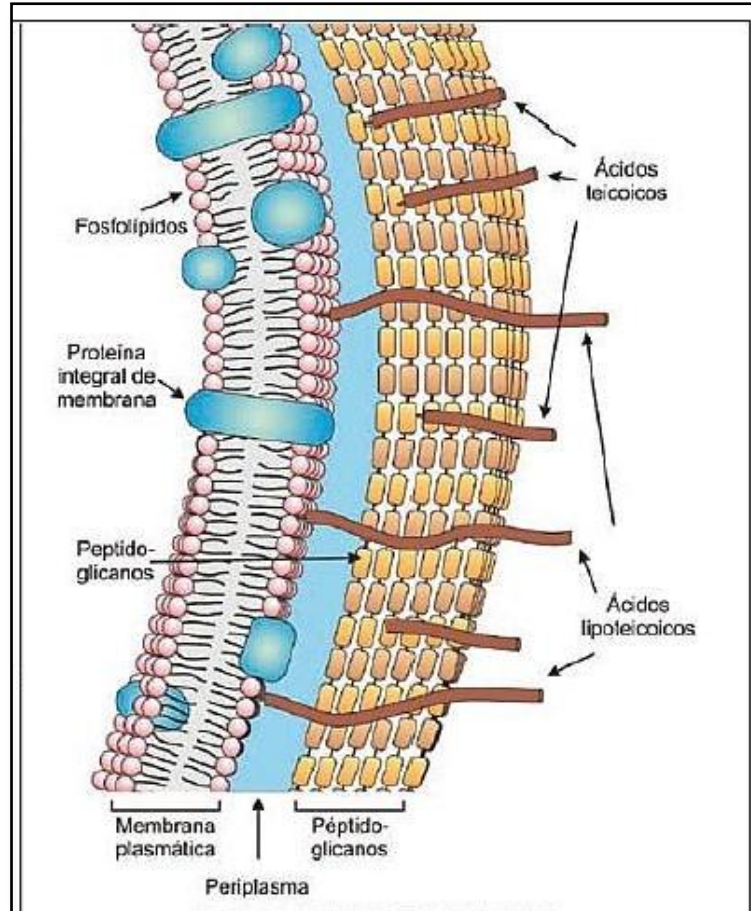


Figura 3. Esquema de la pared bacteriana Grampositiva. Fuente: Lizarbe-Iracheta, 2009.

2.3.2.1. *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* de la familia *Staphylococcaceae* está conformado por células esféricas Grampositivas de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, que tienden a agruparse irregularmente en forma de racimos, son inmóviles, no forman esporas, por lo general son catalasa positiva y sin cápsula o con la formación limitada de esta. Por lo general proliferan con facilidad en la mayoría de los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerófilas a una temperatura de 37°C. Los ácidos teicoicos son antígenos específicos de este género (Llop *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus es la especie tipo de los estafilococos patógenos, siendo así la especie más importante del género (Paganini *et al.*, 2006). Son microorganismos en forma de cocos con un diámetro de 0.8 a 1.2 μm , inmóviles,

aerobios facultativos, catalasa positiva, oxidasa negativa, no forman esporas (Ramírez-Cuenca, 2005), producen coagulasas o fermentan el manitol, forman colonias de color gris a amarillo dorado no difusible (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001), aunque es posible que en ocasiones carezcan de pigmento, y suelen crecer a una temperatura entre 7 y 48°C, siendo de 35 a 40°C la temperatura óptima (Ramírez-Cuenca, 2005).

Forma parte de la flora normal de las personas sanas y se halla en la mucosa nasal del 20-40% (portadores nasales) y en la piel del 10-20%, especialmente en las manos y periné (Pumarola *et al.*, 1997), además puede ser aislada de heces y en algunas ocasiones, del suelo, agua de mar y el agua dulce, la superficie de las plantas, el polvo y el aire (Ramírez-Cuenca, 2005).

Sin embargo es considerada una bacteria oportunista, ya que tiene la capacidad de producir lesiones supurativas e inflamatorias en casi cualquier tejido, donde estos pueden ser casi insignificantes, hasta de alta gravedad e incluso generar un cuadro mortal. Otro aspecto importante es el poder de desarrollar resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, siendo así la colonización en el hombre un gran peligro, sobre todo en enfermos hospitalizados e infectados por las cepas resistentes de este ambiente hospitalario (Romero-Cabello, 2007).

La patogenicidad de esta cepa está ligada a varios factores como el de poseer en ocasiones una cápsula que inhibe la fagocitosis; así también con el producir enzimas y toxinas que permiten su establecimiento, multiplicación y propagación a otros órganos y sistemas, además de la colonización de sitios específicos del hospedero, y la elaboración de slime, el cual es un glicoconjugado extracelular, que desempeña un importante papel en la ocurrencia de enfermedades (Llop *et al.*, 2001).

Entre las diversas toxinas que dañan los tejidos o aumentan la virulencia de este microorganismo se encuentra la toxina del tipo serológico A que se correlaciona con la producción de coagulasa, la cual se fija de manera no enzimática con el

fibrinógeno para producir agregación bacteriana (Llop *et al.*, 2001; Tortora *et al.*, 2007).

Este polisacárido A se encuentra constituido por ácidos teicoicos, polímeros de glicerol fosfato de ribitol, que se enlazan al peptidoglucano, y son antigénicos, formando así el complejo peptidoglucano-ácido teicoico, el cual es el sitio de fijación del bacteriófago. Esta proteína A se encuentra en muchas cepas de *S. aureus*, y puede liberarse al medio, teniendo la capacidad de fijarse a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G, salvo la IgG 3, fijándose también a la extremidad Fab de las IgG específicas, y activar el complemento (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001).

Otra toxina importante elaborada por el fago grupo II, y mediada por plásmidos o cromosomas es la toxina exfoliativa, conocida también como toxina epidermolítica, que se constituye por al menos dos proteínas, que se encarga de dividir la capa del estrato granuloso por desdoblamiento de los desmosomas que unen a las células de esta capa, produciendo así la descamación del síndrome estafilocócico de piel escaldada (Llop *et al.*, 2001), se caracteriza por la aparición de lesiones bullosas de la piel, que en un cuadro de gravedad produce exfoliación cutánea generalizada (Pumarola *et al.*, 1997).

La toxina llamada toxina 1, del síndrome de choque tóxico (TSST-1, Toxic Shock Syndrome Toxin 1), es un superantígeno prototípico que promueve las manifestaciones diversas del síndrome de choque tóxico, que se asocia con fiebre elevada, shock, vómitos, diarreas, trombocitopenia, insuficiencia renal y hepática, afecciones de aparatos y sistemas múltiples, incluyendo un exantema descamativo en la palma de las manos y planta de los pies (Llop *et al.*, 2001).

Se conocen por lo menos, seis toxinas solubles designadas con letras de la A a la F, producidas por casi el 50% de las cepas de *S. aureus* (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001). Estas enterotoxinas son termoestables (ya que soportan ebullición durante 30 minutos), y son resistentes a la acción de las enzimas intestinales (Tortora *et al.*, 2007). Desempeñan un importante papel en cuanto a la intoxicación

alimentaria, pues tras un periodo de incubación de 1 a 6 horas, provoca vómitos, cólicos abdominales y diarrea, donde la recuperación es completa en un lapso de 1 a 2 días (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001; Tortora *et al.*, 2007).

El reservorio de esta cepa responsable de intoxicación alimentaria, es el hombre, y en raras ocasiones, las vacas con ubres infectadas. La vía de transmisión son los alimentos ricos en proteínas y carbohidratos no cocidos o insuficientemente calentados (pasteles, flanes, natillas, ensaladas, carnes enlatadas, etc), donde al estar en temperatura ambiente pueden ser contaminados por dicha cepa, multiplicarse y libera en ellos la toxina causante del cuadro clínico, la mayoría de las personas son susceptibles a esta sustancia (Llop *et al.*, 2001; Tortora *et al.*, 2007).

2.3.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

Esta bacteria Grampositiva de la familia *Staphylococcaceae* se caracteriza por no producir coagulasa, no fermentar el manitol, las colonias son generalmente de color gris a blanco aporcelanado en el aislamiento primario (Pumarola *et al.*, 1997) y muchas colonias pueden desarrollar pigmentos con una incubación prolongada, más no en condiciones de anaerobiosis; cuando se siembra en agar sangre, agar infusión cerebro-corazón, agar-soya-tripticosa o P-agar, se obtienen colonias circulares, lisas, elevadas y resplandecientes con un diámetro de 1 a 3 mm, tras una incubación de 18 a 24 horas a una temperatura entre 34 y 37°C (Llop *et al.*, 2001).

Es un colonizador abundante de la piel, en especial en los lugares húmedos y zonas de transición del epitelio mucoso, por lo que durante mucho tiempo fue considerado como inocuo, pero actualmente se describe como un patógeno oportunista debido a que es el responsable de la mayoría de las infecciones nosocomiales (Vuong y Otto, 2002; Romero-Cabello, 2007; Baos, 2017), además es resistente a diversos antibióticos pero sensible a la novobiocina, y hay que tener en cuenta que un 10% de las cepas pueden ser hemolíticas (Pumarola *et al.*, 1997).

Esta especie no es productora de toxinas ni nucleasas termoestables (Pumarola *et al.*, 1997), sin embargo posee otros mecanismos de patogenicidad como las biopelículas, enzimas y otras sustancias que le ayudan a colonizar tejidos y materiales del ámbito hospitalario (Baos, 2017).

S. epidermidis, contiene un polisacárido B que es un polímero de glicerol fosfato ribitol y puede funcionar como antígeno al enlazarse al peptidoglucano, creando así un complejo peptidoglucano-ácido teicoico, siendo este el sitio de fijación del bacteriófago (Pumarola *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2001), además de que es de utilidad para la adhesión y colonización de la bacteria, y por otro lado, estudios recientes han señalado su participación en la formación de la biopelícula (Baos, 2017).

La biopelícula es una aglomeración de bacterias que le brinda protección frente a los antibióticos y a los mecanismos de defensa del huésped, y es de gran importancia para la supervivencia de la bacteria sobre todo en biomateriales y catéteres, donde de esta manera pueden colonizar y persistir fácilmente para continuar con la formación de la misma (Baos, 2017).

También produce moléculas que proporcionan protección frente a las defensas del huésped como las proteínas y exopolímeros, tal como el exopolisacárido PIA, que contribuye a la formación de biopelículas e inhiben la fagocitosis. En investigaciones recientes han logrado identificar una familia de péptidos pro-inflamatorios, conocidas como modulinas solubles en fenol (phenol soluble modulins PSMs), que además tienen actividad lítica frente a leucocitos y eritrocitos y se encuentran implicadas en la formación de la biopelícula (*Ídem*).

Posee el poli- γ -glutámico (PGA), un homopolímero lineal de residuos de ácido glutámico, tiene la función de protegerlo de los AMP (péptidos antimicrobianos). Producen una serie de proteasas, las cuales pueden contribuir a la virulencia de la bacteria a través de la destrucción del tejido y proteínas del huésped (*Ídem*).

S. epidermidis ha sido aislado en un 74 a 92% en bacteriemias intrahospitalarias; es el causante común de infecciones urinarias como la cistitis, uretritis y pielonefritis, y en raras ocasiones es responsable de supuraciones. Es capaz de infectar prótesis cardiovasculares, causando así infecciones cardíacas en los pacientes tras una sustitución vascular, cirugía cardiovascular o cardiotoromía, lo que posiblemente pueda generar sepsis, siendo este el cuadro más grave (Pumarola

et al., 1997; Llop *et al.*, 2001), cabe mencionar que este agente infeccioso afecta principalmente a los drogadictos y a los pacientes inmunocomprometidos, tales como los pacientes sometidos a terapia inmunosupresora, pacientes con SIDA y recién nacidos prematuros (Vuong y Otto, 2002).

2.3.2.3. *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos Grampositivos, que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos, son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía de 0.5 a 2.5 μm . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos (Winn *et al.*, 2008).

Las cepas de *B. subtilis* son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, producen endosporas con morfología oval o cilíndrica que le permite resistir condiciones desfavorables en el ambiente, y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación la radiación los ácidos y los desinfectantes químicos (Cuervo, 2010; Ramos, 2014), son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva, presentando hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5-8.5, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos y ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, además producen antibióticos como la bacitricina, polimixina, gramicidina y circulina, pueden fermentar la caseína y el almidón, y tienden a vivir dentro de los límites de 55 a 70°C (Cuervo, 2010; Layton *et al.*, 2011).

La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda. Las células en crecimiento no se propagan fácilmente en medios líquidos. Estos microorganismos por lo general crecen bien en agar

sangre, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares (Layton *et al.*, 2011).

No es una bacteria potencialmente patógena, puesto que no produce endotoxinas, pero secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilinas y otros antibióticos de la familia iturinas. La subtilina secretada por *B. subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos (Cuervo, 2010).

Sin embargo en ciertas ocasiones puede ser un agente productor de enfermedades transmitidas por alimentos. Ha sido identificado como agente causal de brotes asociados al consumo de carne, pastas y arroz con mariscos. El período de incubación promedio es de 2.5 horas, los vómitos son el síntoma predominante; alrededor del 10% de los enfermos presenta cefalea y sudoración (González y Cecchini, s/f).

Un dato importante sobre este microorganismo es el de ser un gran controlador biológico, ya que promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por diversos agentes (Cuervo, 2010).

2.3.2.4. *Streptococcus pyogenes*

El género *Streptococcus*, perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, se constituye por una gran diversidad de especies, las cuales desde una perspectiva taxonómica, causan muchas enfermedades que provocan gran cantidad de dolencias, aún mayor que cualquier otro grupo de bacterias. La especie tipo del género es *Streptococcus pyogenes* (Llop *et al.*, 2001; Tortora *et al.*, 2007).

Los estreptococos son bacterias Grampositivas con forma esférica u ovoide con un diámetro menor a 2 μm , típicamente se encuentran dispuestas en cadenas, son inmóviles, no forman esporas, son catalasa y oxidasa negativos. Por lo general crecen en medios sólidos, forman colonias discoidales, grises, opalescentes, delicadas, de bordes lisos o arrugados, y miden entre 0.5 y 2 mm o más de diámetro. Estas colonias se aprecian en placas de agar-sangre, regularmente en un periodo de 18 a 24 horas (Llop *et al.*, 2001).

S. pyogenes (estreptococo del grupo A de Lancefield) es un coco aerobio o anaerobio facultativo de 0.6-1 μm de diámetro, aparecen como parejas o cadenas de tamaño corto. Son inmóviles, no forman esporas, no producen catalasa. Generalmente se cultiva en medio enriquecidos con agar sangre o suero (Aracil y Alós, s/f). Son β -hemolíticos cuya acción patógena se debe a antígenos de superficie, fermentos y toxinas (Sibón *et al.*, 2017). Se caracteriza por ser un patógeno β -hemolítico y poseer antígenos del grupo A, produce la hidrólisis de l-pirrolidonil-2-naftilamida (positivos a PIR) y son susceptibles a la bacitracina (Llop *et al.*, 2001).

La pared bacteriana se compone de peptidoglucano, ácido teicoico, hidratos de carbono y antígenos proteico de superficie, además se encuentra cubierta de protrusiones o fimbrias formadas por los antígenos proteínicos M, T, y R, y por ácido lipoteicoico (Llop *et al.*, 2001). De estos, el principal factor de virulencia es la proteína M que se encuentra en la superficie bacteriana, y que es responsable de impedir la fagocitosis (Tortora *et al.*, 2007).

Las proteínas M, proteínas fribilares estables al ácido, termoestables y lábiles a la triptisina asociadas con la superficie externa de la pared celular, se conforman por dos cadenas polipeptídicas que forman un complejo entre ellas, con una configuración de hélice α enrolladas entre sí. Esta proteína aparte de evitar la fagocitosis, es capaz de resistir la destrucción intracelular por leucocitos polimorfonucleares y formar complejos de fibrinógeno que se unen a integrinas β_2 de los neutrófilos, produciendo la liberación de mediadores inflamatorios que provocan la pérdida vascular, un componente patológico del shock tóxico estreptocócico (Winn *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen algunas cepas que poseen una cápsula, constituida por polisacáridos, donde el ácido hialurónico, es la estructura más externa, siendo este el producto de enzimas codificadas por un grupo de tres genes (hasA, hasB y hasC), que ayuda a los microorganismos a resistir la destrucción de las células fagocíticas dependiente del complemento (Llop *et al.*, 2001; Winn *et al.*, 2008).

También existen toxinas elaboradas por esta bacteria, dentro de las cuales destacan las estreptolisinas y la toxina eritrogénica; las primeras se dividen en dos tipos: a) estreptolisina O, oxígeno-lábil (SLO), es antigénica, y en combinación con el colesterol de la membrana de los eritrocitos, causa la hemólisis en placas de agar-sangre en profundidad o en condiciones anaerobias. Posee propiedades tóxicas para distintos tipos celulares, tales como los leucocitos (leucocidina), el tejido cardíaco (cardiotóxica), además de monocitos y células en cultivo; b) estreptolisina S, oxígeno-estable (SLS), la cual no es antigénica, al estar en combinación con los fosfolípidos de la membrana es la responsable de la hemólisis en las placas de agar-sangre en presencia de aire, es decir, en la superficie. Al igual que SLO es tóxica para los leucocitos (leucocidina) (Pumarola *et al.*, 1997; Winn *et al.*, 2008).

La toxina eritrogénica, también denominada exotoxina pirógena estreptocócica (SPE), es una exotoxina termolábil y se encarga de la erupción de la escarlatina, así como de los principales factores de virulencia del síndrome similar al shock tóxico estreptocócico (Pumarola *et al.*, 1997; Winn *et al.*, 2008).

Por otra parte se conocen otros factores importantes tales como la estreptoquinasa y la estreptodornasa; la primera transforma el plasminógeno en plasmina, hidrolizando los coágulos de fibrina, evitando la formación de las barreras de fibrina en la periferia de las lesiones estreptocócicas que se propagan, ayudando así a la virulencia del microorganismo (Winn *et al.*, 2008); mientras que la segunda desdobla el ADN, disminuye la viscosidad del pus y exudados. Ambas son antigénicas (Pumarola *et al.*, 1997).

Además se conocen otros menos significativos como son la hialuronidasa, las esterases, proteinasas y nicotinamida-adenina-dinucleotidasas, que actúan sobre el tejido conectivo y contribuyen en gran parte a la propagación de las bacterias y a la producción de fenómenos inflamatorios y de necrosis (Pumarola *et al.*, 1997; Winn *et al.*, 2008).

Se sabe que los únicos reservorios conocidos para este microorganismo son la piel y las mucosas de los seres humanos, y la transmisión de una persona a otra

se da por vía respiratoria (Winn *et al.*, 2008). Causa un gran número de infecciones y secuelas, que aparecen con mayor frecuencia en niños, adolescentes y adultos jóvenes (Llop *et al.*, 2001). Entre las enfermedades causadas por *S. pyogenes* están la escarlatina, la faringitis (angina), la erisipela, el impétigo y la fiebre reumática (Tortora *et al.*, 2007).

La amigdalofaringitis estreptocócica es la infección bacteriana más frecuente de la garganta y puede evolucionar y producir abscesos o linfadenitis cervical, sinusitis, otitis media, mastoiditis e, incluso, meningitis. Así también puede originar neumonías en las vías respiratorias inferiores. Cabe señalar que cuando el microorganismo elabora la exotoxina pirógena estreptocócica (SPE), se produce un exantema escarlatinoso, que da lugar al cuadro clínico conocido por fiebre escarlatina (Llop *et al.*, 2001).

2.4. Metabolitos secundarios de las plantas

Las plantas, organismos autótrofos, que además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa (Ávalos y Pérez-Urria, 2009), también denominados metabolitos secundarios (MS), los cuales más que ser subproductos metabólicos, funcionan en la interacción de las plantas con su ambiente y otros organismos, además las defienden contra la infección, la depredación y el agobio ambiental, de la competencia con otras especies, del consumo por parte de los herbívoros, atraen a los polinizadores y son útiles también en la dispersión y protección de frutos y semillas (Alcantar-Aguirre, 2005; Rivera-Núñez y Obón de Castro, 2007).

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales, teniendo un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Su importancia reside en que muchos de éstos eran utilizados en la medicina antigua para tratar y combatir diversas enfermedades, por lo que actualmente estos mismos

tienen un uso para la fabricación de medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Globalmente las plantas producen más de 100 000 productos naturales llamados también MS de bajo peso molecular (Domingo y López-Brea, 2003), los cuales son con frecuencia sustancias responsables del aroma, color, sabor y cualidades medicinales de las mismas. Algunas de estas sustancias que sirven para proteger a la planta pueden ser utilizadas en un sentido similar por el ser humano, sin embargo no siempre sucede, puesto que muchos metabolitos secundarios son tóxicos (Rivera-Núñez y Obón de Castro, 2007).

Se sabe que especies muy relacionadas taxonómicamente o del mismo género pueden tener distintos tipos de metabolitos secundarios, o tener los mismos en diferentes proporciones. Esta alteración de las proporciones también se da en la propia planta, pudiendo encontrarse mayor concentración de un metabolito en las hojas, en las raíces, en los tallos o en los frutos (Dueñas-Ricaurte, 2009) y, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Además su producción en muchas ocasiones es restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los precursores de la biosíntesis de los MS o productos naturales derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del Shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de metabolitos secundarios puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también metabolitos secundarios que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico y a su vez estos productos no se distribuyen de manera uniforme en la planta (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Alcantar-Aguirre, 2005).

Estos compuestos no son esenciales para el funcionamiento de las células vegetales y no participan en las transformaciones bioquímicas comunes. Su presencia puede llegar a ser tan específica que solo ciertas especies de una familia

pueden producirlos, proporcionando así una forma de caracterizar quimiotaxonómicamente a las plantas (Dueñas-Ricaurte, 2009).

En la actualidad se conocen aproximadamente 20 000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos, y los no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenoles o fenilpropanoides (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

2.4.1. Metabolitos secundarios nitrogenados: alcaloides

Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas (Lock de Ugaz, 2000), son compuestos heterocíclicos con nitrógeno y, como su nombre indica, sustancias generalmente de carácter básico, aunque existen muchas excepciones. El término abarca sustancias pertenecientes a grupos no relacionados entre sí, entre cuyos precursores se encuentran varios aminoácidos (Ramos *et al.*, 1998).

Esta familia de compuestos presenta tres características importantes: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los alcaloides han sido aislados tradicionalmente de las plantas vasculares, de las cuales alrededor del 20% los contienen, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Ávalos-García, 2009) y de las especies de las plantas que florecen (Alcantar-Aguirre, 2005). Actualmente se ha reportado la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos en animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos (Loyola-Vargas *et al.*, 2004).

Su distribución es abundante en Angiospermas, especialmente dicotiledóneas, siendo familias particularmente ricas en estos compuestos: Apocynaceae, Asteraceae, Loganiaceae, Papaveraceae, Rubiaceae, Ranunculaceae, Solanaceae, etc. Entre las monocotiledóneas destaca su presencia en dos familias: Amaryllidaceae y Liliaceae. Aparecen raramente en hongos, criptógamas y gimnospermas (Carretero-Accame, 2001a).

Los alcaloides se pueden dividir en los siguientes grupos: alcaloides isoquinolólicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

Los primeros pasos de la farmacología experimental se iniciaron con el estudio de alcaloides (Carretero-Accame, 2001a). Una gran cantidad de alcaloides han sido empleados en la medicina, y muchos de ellos aún son prominentes fármacos hoy en día (Loyola-Vargas *et al.*, 2004). Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas en estado libre como glicósidos, o formando sales con ácidos orgánicos (Lock de Ugaz, 2000).

Varios alcaloides son tóxicos para insectos o parásitos, aunque algunas especies de insectos se han adaptado a los alcaloides pirrolizidinos que se acumulan en las plantas (Alcantar-Aguirre, 2005). A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009) teniendo una significativa actividad farmacológica y han sido biosintetizados utilizando aminoácidos como precursores (Lock de Ugaz, 2000).

Se ha reportado el efecto antibacteriano de los alcaloides obtenidos de la corteza de tronco de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., inhibiendo a las cepas Grampositivas: *S. aureus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis* (Guida y Bargardi, 2003).

De las plantas de *Pleurothyrium cinereum* van der Werff, *Esenbeckia alata* Karst & Triana y *Raputia heptaphylla* Pittier, han sido obtenidos un alcaloide indólico y la acrilamida, el primero demostró ser eficaz contra *Enterococcus faecalis*, mientras que el segundo alcaloide inhibió a *Staphylococcus aureus* (Cuca-Suárez *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo. Un ejemplo son los derivados de la corteza de la *Cinchona officinalis* L., de donde se obtiene quinina y quinidina (figura 4) que son utilizados en el tratamiento de la malaria (Domingo y López-Brea, 2003).

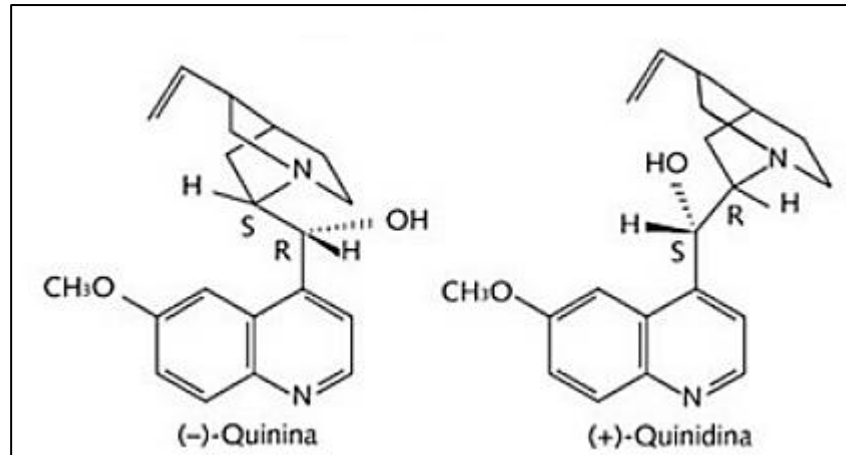


Figura 4. Estructura química de quinina y quinidina. Fuente: Castillo y Martínez, 2007.

2.4.2. Metabolitos secundarios que no contienen nitrógeno

2.4.2.1. Fenoles

También denominados compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides, que derivan del fenol (figura 5), un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Ávalos y Pérez-Urria, 2009), suelen encontrarse ampliamente distribuidos en las frutas y vegetales. En su mayoría derivan de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de sustancias, con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas. Existen más de 8 000 compuestos fenólicos identificados (Porrás-Loaiza *et al.*, 2009), algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.) (Carretero-Accame, 2000).

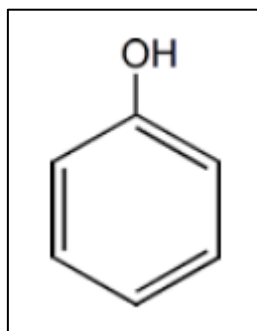


Figura 5. Estructura química del fenol. Fuente: Ávalos y Pérez-Urria, 2009.

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikímico y la ruta del acetato. La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas, mientras que la ruta del acetato es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, es poco empleada por las plantas superiores (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

De la primera ruta mencionada proceden los fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc), cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas y taninos. De la segunda ruta se biosintetizan las antraquinonas y los heterósidos antracénicos (Kuklinski, 2003).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar según su complejidad estructural y su origen biosintético. El grupo más sencillo corresponde a los fenoles propiamente dichos, los ácidos fenólicos de 7 a 9 átomos de carbono, tales como los ácidos gálico y p-cumárico, y las cetonas polifenólicas. Los otros grupos considerados son los fenilpropanoides, las xantonas, los estilbenos y las quinonas (benzo-, nafto- y antraquinonas). Por último, destacan los flavonoides o flavanos de 15 átomos de carbono, que suponen aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos presentes en las plantas y que se pueden clasificar en cinco grupos diferentes: antocianinas (pigmentos), flavonoides menores (que incluyen flavanonas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas), flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados (proantocianidoles) (Castillo y Martínez, 2007) (cuadro 3).

En este grupo se incluyen compuestos poco abundantes en la naturaleza y de escaso valor terapéutico a excepción de la hidroquinona, que en forma de glucósido se localiza en algunas plantas medicinales pertenecientes a las familias Ericaceae y Rosaceae. De todas ellas, las más empleadas por su poder antiséptico de vías urinarias es la gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng.) que contiene el fenol sencillo denominado arbutósido y que por hidrólisis produce hidroquinona y glucosa (Carretero-Accame, 2000; Kuklinski, 2003).

Cuadro 3. Compuestos fenólicos producidos por plantas.

Clase de compuestos	Número de átomos de carbonos	Esqueleto base
Ácidos fenólicos	7	C ₆ -C ₁
Fenilpropanoides (cumarinas, cromonas, benzofuranos y lignanos)	9	C ₆ -C ₃
Xantonas	13	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos y antraquinonas	14	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides e isoflavonoides	15	C ₆ -C ₃ -C ₆
Taninos condensados y no condensados	N	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Fuente: Castillo y Martínez, 2007; Vatterm *et al.*, 2005.

El aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) posee una elevada actividad antibacteriana y antifúngica, atribuida principalmente a los fenoles timol y carvacrol (Castillo y Martínez, 2007). El ácido antémico obtenido de *Matricaria chamomilla* L. tiene actividad antimicrobiana sobre las bacterias *S. aureus* y *Salmonella thyphymurium* (Domingo y López-Brea, 2003).

Además el lapachol (figura 6) presente en las plantas de los géneros *Tabebuia spp.* y *Tecoma spp.* de la familia Bignoniaceae, posee actividad antibacteriana, antitumoral, antimalárica, antifúngica, antiparasitaria y anticancerígena (López *et al.*, 2011).

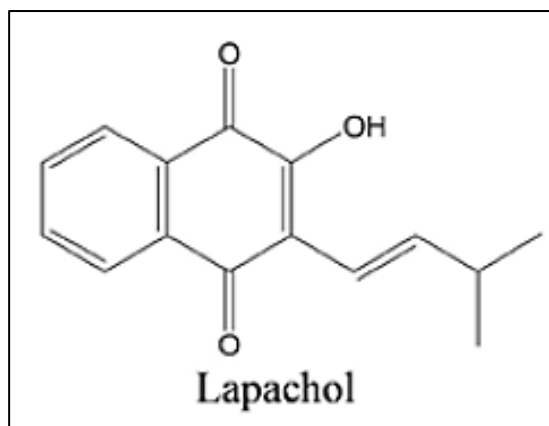


Figura 6. Estructura química del lapachol. Fuente: López *et al.*, 2011.

A los fenoles también se les confieren otras propiedades como: antibióticos, pesticidas naturales, agentes protectores de los rayos UV y aislantes en las paredes celulares (Porras-Loaiza y López-Malo, 2009).

Se cree que el mecanismo responsable de toxicidad en los microorganismos, incluye la inhibición de la enzima por compuestos oxidados, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilo o a través de interacciones no específicas con las proteínas (Cowan, 1999).

Taninos

Son compuestos polifenólicos con un peso molecular comprendido entre 500 y 3 000 Daltons (Castillo y Martínez, 2007). Comprenden una pequeña parte del diverso grupo de fenoles vegetales, y las ligninas, las cuales tienen un alto grado de polimerización (Ramos *et al.*, 1998). Son hidrosolubles, dando a veces disoluciones coloidales en agua, solubles también en alcohol y en acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares (Carretero-Accame, 2000).

El contenido en taninos de árboles y arbustos varía ampliamente entre especies así como estacionalmente y con el estado fenológico de la planta (Ramos *et al.*, 1998). Se localizan en algunas dicotiledóneas, especialmente en Fagaceae, Anacardiaceae y Leguminosae (Carretero-Accame, 2000).

De las actividades farmacológicas de los taninos destacan sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. Por vía interna se emplean como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad por cierto efecto antiséptico, ya que precipitan las enzimas extracelulares secretadas por los microorganismos causantes de las infecciones, lo que hace que sean de utilidad en diarreas infecciosas (*Ídem*).

Los taninos se clasifican en dos grupos: no hidrolizables o condensados (proantocianidinas) e hidrolizables (figura 7), estos últimos tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente ya sea con el ácido gálico o el ácido hexahidroxidifénico, formando los galotaninos y elagitaninos respectivamente (Porras-Loaiza y López-Malo, 2009).

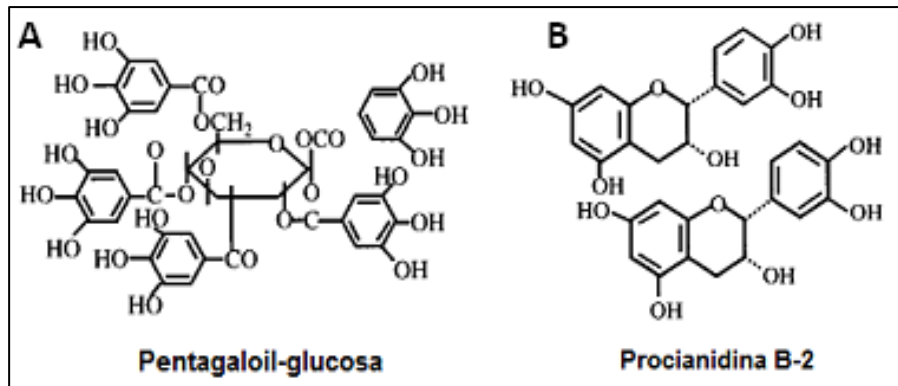


Figura 7. Estructura química de los taninos. A) hidrolizable; B) no hidrolizable. Fuente: Cowan, 1999.

Ambos tipos de taninos se encuentran en casi todas las partes de la planta: corteza, madera, hojas, frutos y raíces (Cowan, 1999), sin embargo predominan en hojas de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas (Ramos *et al.*, 1998). Aunque su distribución es desigual, dado que los no hidrolizables están presentes de forma general en todos los grupos vegetales, incluidos helechos y gimnospermas, mientras que los hidrolizables sólo están presentes en dicotiledóneas (Castillo y Martínez, 2007).

Entre sus acciones moleculares está la formación de complejos con proteínas a través de las llamadas fuerzas no específicas, como los enlaces de hidrógeno y los efectos hidrófobos, así como la formación de enlaces covalentes. Por lo tanto, su modo de acción antimicrobiano, puede relacionarse con la capacidad de inactivar las adhesinas microbianas, las enzimas y las proteínas de transporte de la envoltura celular, entre otras (Cowan, 1999).

Los **taninos condensados** también conocidos como proantocianidinas o no hidrolizables (Carretero-Accame, 2000), son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). El tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos). Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal (Carretero-Accame, 2000).

Químicamente se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavanoles) con uniones directas C-C entre las moléculas, generalmente en 4 y 8 o en 4 y 6 y no contienen azúcares en su estructura. Biogénicamente proceden del metabolismo de los flavonoides, se forman a partir de una flavanona por hidroxilación en el C-3, la unidad básica es el flavan-3-ol (*Ídem*).

Los **taninos hidrolizables** llamados también gálicos o pirogálicos son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009) y se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática y son generalmente de formación patológica (Carretero-Accame, 2000).

Con relación al efecto biológico se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) (Domingo y López-Brea, 2003). Además las plantas con taninos se utilizan frecuentemente como antidiarreicos y en el tratamiento de heridas y quemaduras, pues favorecen la cicatrización de éstas, gracias a su capacidad astringente (Castillo y Martínez, 2007).

Otro tanino aislado a partir del fruto de la granada (*Punica granatum* L.) es la punicalagina que tiene actividad antibacteriana sobre *S. aureus* meticilina resistente (Machado *et al.*, 2002).

La juglona, obtenida a partir de las hojas y semillas del nogal (*Juglans regia* L.) es un tanino condensado que se utiliza principalmente como astringente y antiséptico (Kuklinski, 2003). Éste y la 7-metiljuglona han sido obtenidos de *Diospyros lycioides* Desf., presentando actividad contra *Streptococcus mutans* y *S. sanguis* responsables de la caries dental, y sobre *Poryphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* causantes de gingivitis (López *et al.*, 2011).

Flavonoides

Los flavonoides son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y, por tanto, son polifenólicas (figura 8). Tienen bajo peso molecular, comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a

través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Dueñas-Ricaurte, 2009).

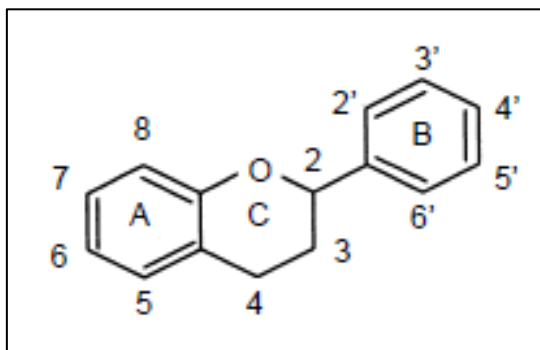


Figura 8. Estructura básica de los flavonoides. Fuente: Martínez-Flórez *et al.*, 2002.

Están ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores, siendo las rutáceas, poligonáceas, compuestas y umbelíferas las principales familias que los contienen. Abundan, sobre todo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como hojas, flores y frutos, ya que la luz solar favorece su síntesis (López-Luengo, 2002; Kuklinski, 2003).

Cabe mencionar que se encuentran en plantas, semillas, flores, frutas, verduras, bebidas como el vino, la cerveza, el té verde, el té negro y soja (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, presentando en general actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica P (efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares). Son también reconocidos por su potencial antioxidante, el cual depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres (López-Luengo, 2002).

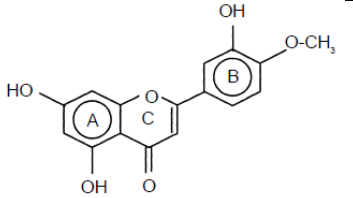
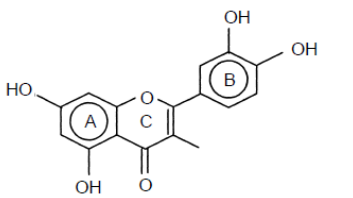
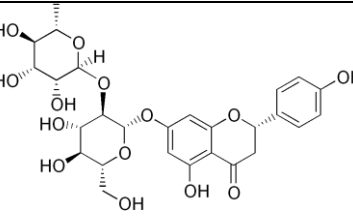
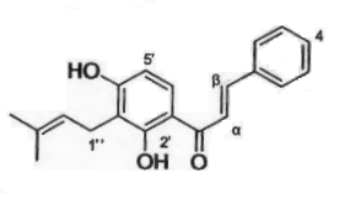
Se agrupan en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son moléculas de pigmentos rojos, azules y púrpuras. Las antoxantinas, que incluyen flavonoles,

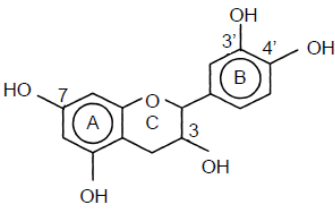
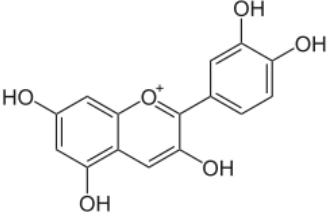
flavonas, e isoflavonas, son moléculas incoloras o de colores que van desde el blanco hasta el amarillo (Dueñas-Ricaurte, 2009).

Se diferencian entre sí por el grado de insaturación y sustituyentes del anillo C. Se pueden distinguir entre compuestos que poseen un radical cetónico en el heterociclo: flavonas, flavonoles, flavanonas (dihidroflavonas) y chalconas, y los que no lo poseen: flavanoles y antocianidinas (cuadro 4) (Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002). Son más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas (Lock de Ugaz, 2000).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar de la siguiente manera:

Cuadro 4. Principales tipos de flavonoides.

Tipo de flavonoide	Estructura	Ejemplo	Efecto
Flavonas		<p>Diosmetina <i>Ginkgo biloba</i> L.</p>	<p>Antioxidante, tónico venoso, vasoprotector y antiagregante plaquetario.</p>
Flavonoles		<p>Quercitina <i>Silybum marianum</i> L. Gaernt.</p>	<p>Hepatoprotector, antioxidante y antirradical.</p>
Flavanonas		<p>Naringina <i>Citrus paradisi</i> Macfad.</p>	<p>Antiinflamatorio, vasoprotector, antibacteriano y antiagregante plaquetario.</p>
Calconas o chalconas		<p>Isocordoína <i>Lonchocarpus xuul</i> Lundell</p>	<p>Antiprotozoario, antitumoral.</p>

Flavanos		Catequina <i>Salix caprea</i> L.	Antiinflamatorio y antihepatotóxico.
Antocianidinas		Cianidina <i>Dioscorea trifida</i> L.	Antioxidante, antiinflamatorio

Fuente: Cartaya y Reynaldo, 2001; López-Luengo, 2002; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Rivas y García, 2002; Castillo y Martínez, 2007; Ramírez Escobedo *et al.*, 2012.

Las flavonas no se encuentran frecuentemente en frutas pero sí en cereales y muchas plantas herbáceas (Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002). Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con la pared de la célula bacteriana (Domingo y López-Brea, 2003).

Los flavonoles más destacables son el rutósido o rutina y la silimarina. El rutósido es un ramnoglucósido de la quercetina (flavonol) y tiene acción venotónica, antiespasmódica, antihemorrágica y antirreumática (López-Luengo, 2002). Se encuentran repartidos abundantemente en todos los alimentos de origen vegetal, y las pieles u hollejos de las frutas son particularmente ricas en estos compuestos. Se encuentran distribuidos en plantas superiores, aunque son predominantes en las frutas (Rivas-Gonzalo y García-Alonso, 2002).

Las catequinas presentes en el té verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) ejercen actividad frente a *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans* y *Shigella* (Domingo y López-Brea, 2003).

Se ha mencionado que flavonoides tales como avicularina, guayajaverina y quercetina aislados de la cáscara verde y pulpa verde de *Psidium guineense* Sw. han

tenido efecto contra la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 31089 (Neira *et al.*, 2005).

También los compuestos absinona I y V de *Erythrina abyssinica* Lam., han presentado actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Castillo y Martínez, 2007). Las pinocembrinas 5,7-dihydroxiflavanona y 2,4,6-trihydroxichalcona, aisladas de *Piper lanceaefolium* H.B. & K. tienen capacidad inhibitoria para *Neisseria gonorrhoeae* (Ruddock *et al.*, 2011). Otro ejemplo, es el de los flavonoides quercetagina 7-O-glucósido y quercetagina 7-O-arbinosil galactósido aislados de *Tagetes minuta* L., teniendo efecto frente a varias bacterias: *Escherichia coli* DH5a, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*, siendo las Gramnegativas fueron más susceptibles (Tereschuk *et al.*, 2007).

La actividad antimicrobiana de los flavonoides probablemente se debe a su capacidad de formar complejos con proteínas extracelulares y solubles, y con paredes celulares bacterianas, siendo posibles objetivos las adhesinas expuestas en la superficie, los polipéptidos de la pared celular y las enzimas unidas a la membrana (Cowan, 1999).

2.4.2.2. Glucósidos

Un glucósido, de acuerdo a Pacheco Leal (2001) se forma cuando al grupo -OH del carbono anomérico de un monosacárido se le une una molécula que no es un carbohidrato, al cual se denomina aglucona o aglicona. El enlace se denomina glucosídico y es un enlace acetal que resulta de la unión de un hemiacetal y otro grupo -OH.

Son glucósidos muchos medicamentos como los de la digitonina, la cual se ha aislado de *Digitalis purpurea* L. (figura 9), y el antibiótico estreptomycin, fármacos de gran uso en medicina (*Ídem*).

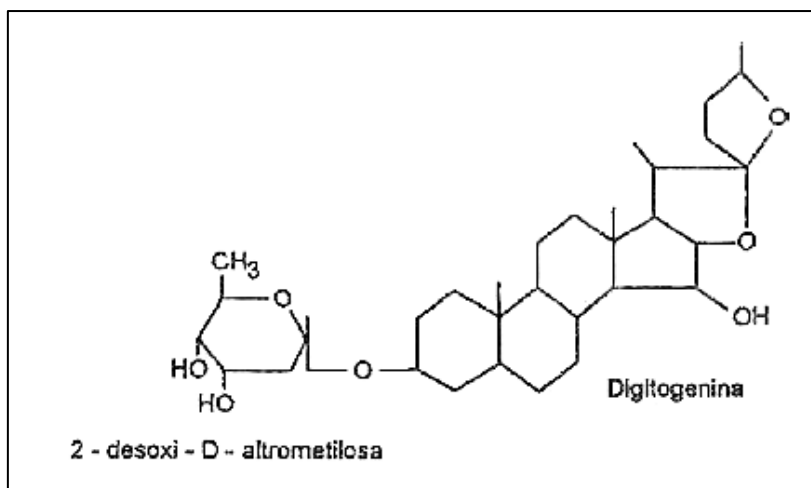


Figura 9. Estructura de la digitonina. Fuente: Pacheco Leal, 2001.

Saponinas

Las saponinas son glicósidos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpénico, esteroidal (figura 10) o esteroidal alcaloide; la cual se une por el hidroxilo del carbono-3 a una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa (Díaz-Puentes, 2009). Cuando se presentan como agliconas, es decir, carecen de azúcar, se denominan sapogeninas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Las saponinas se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita la solución acuosa que las contiene. Se forma espuma debido a que estas disminuyen la tensión superficial del agua, son por lo tanto tensioactivos naturales (Kuklinski, 2003).

Muchas de ellas poseen propiedades hemolíticas, ya que alteran la permeabilidad de las membranas biológicas resultando tóxicas para animales de sangre fría, por lo cual desde la antigüedad algunas plantas que contienen estos compuestos activos se han utilizado en la pesca (Carretero-Accame, 2001b). Sin embargo, esta propiedad hemolítica resulta ser tóxica si es administrada por vía intravenosa, mientras que por vía oral es tóxicamente muy baja (Kuklinski, 2003).

Las saponinas pueden encontrarse en vegetales inferiores como las algas, líquenes, musgos y helechos, hasta en vegetales superiores. A su vez pueden localizarse en cualquier órgano vegetal, pero tienden a acumularse a mayor concentración en las partes subterráneas (raíz, rizoma) (Kuklinski, 2003).

Entre los efectos farmacológicos y biológicos destacan: antimicrobiano, antiviral, antimicótico, citotóxico, expectorante, antitusivo, diurético, antiedematoso, antiinflamatorio, antihemorroidal, antitumoral, cicatrizante, adaptógenos, venotónico, espermicida, antipirético, antihepatotóxico, analgésico, ictiotóxico y molusquicida (Carretero-Accame, 2001b; Martínez-Martínez, 2001; Kuklinski, 2003).

Las saponinas triterpénicas tienen el aglicón con 30 átomos de carbono (triterpeno). Este aglicón procede de la ruta biosintética de la condensación isoprenica, también denominada ruta del ácido mevalónico, por unión de seis unidades de C₅. Todas las saponinas triterpénicas derivan del dammarano (figura 10A) y se subdividen a su vez en: saponinas triterpénicas pentacíclicas y saponinas triterpénicas tetracíclicas (Kuklinski, 2003).

Las saponinas del grupo triterpeno constituyen la mayoría de las saponinas encontradas en la naturaleza, distribuyéndose principalmente en dicotiledóneas por ej. Solanaceae, Caryophyllaceae, Polygalaceae, Sapotaceae y Araliaceae, algunas de las fuentes principales de éstas son el ginseng, la alfalfa, la avena, la quinua y la soya (Lock de Ugaz, 2000; Martínez-Martínez, 2001; Castillo y Martínez, 2007; Díaz-Puentes, 2009).

Las saponinas esteroídicas (figura 10B) también se biosintetizan por la ruta del ácido mevalónico y son generalmente menos frecuentes que las saponinas triterpénicas pentacíclicas. Estas a su vez se pueden clasificar en: derivadas del espirostano y derivadas del furostano (Kuklinski, 2003; Castillo y Martínez, 2007).

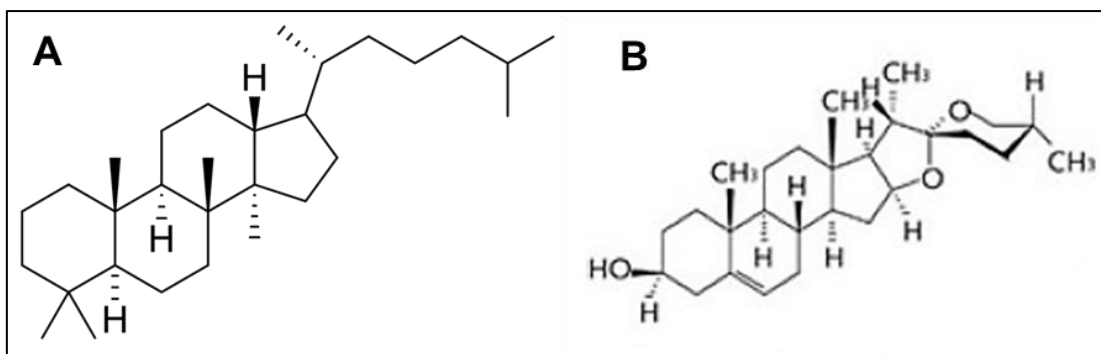


Figura 10. Estructura química de las saponinas. A) Dammarano (saponina triterpénica); B) Diosgenina (saponina esteroidea). Fuente: Kuklinski, 2003; Castillo y Martínez, 2007.

Las saponinas esteroideas se localizan especialmente en plantas monocotiledóneas, en familias como: Dioscoreacea, Liliacea, Scrophulariaceae y Agavacea (Carretero-Accame, 2001b; Martínez-Martínez, 2001; Castillo y Martínez, 2007; Díaz-Puentes, 2009). Algunos ejemplos de estos compuestos son: digitonina (*Digitalis purpurea* L. y *D. lanata* Ehrh.), gitogina (*D. purpurea* L.), tigonina (*D. lanata* Ehrh.), sarsapogenina (*Yucca schott* Engelm.), dioscina (*Dioscorea tokora* Makino), entre otras (Lock de Ugaz, 2000). Cabe mencionar que también se han encontrado en pteridofitas, y en el reino animal sólo las estrellas de mar tienen este tipo de saponinas (Carretero-Accame, 2001b; Martínez-Martínez, 2001).

Aunque algunas saponinas esteroideas han mostrado diversas actividades biológicas, la mayoría de estas (diosgenina y hecogenina aisladas de *Dioscorea sp. pl.* y *Agave sisalana* Perrine, respectivamente) son la base para la preparación de importantes productos farmacéuticos, entre ellos cortisona, anticonceptivos, estrógenos, testosterona, etc. (Lock de Ugaz, 2000; Martínez-Martínez, 2001; Castillo y Martínez, 2007).

Las saponinas encontradas en *Panax ginseng* C.A. Mey poseen actividad sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus spp.* (Domingo y López-Brea, 2003).

En el 2005 Mandal *et al.*, aislaron de *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. dos saponinas bisglicósidas aciladas: acaciaside A y B, las cuales tuvieron efecto contra *Bacillus megaterium*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Las saponinas de *Medicago sativa* L. (syn. *M. media* Pers.), *M. arborea* L. y *M. arabica* (L.) Huds. contra bacterias *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, donde *M. arabica* demostró una importante eficacia contra las Grampositivas (Avato *et al.*, 2006).

En otro estudio Akaniro-Ejim *et al.* (2016), concluyeron que las saponinas de *Vitex doniana* Sweet y *Pentaclethra macrophylla* Benth., inhiben a *Staphylococcus aureus*, mientras que las de la segunda planta además de la Grampositiva, también contrarrestó la actividad de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se cree que el posible mecanismo de acción se deba a que la saponina forma complejos con los esteroides de las membranas celulares, produciendo grandes poros en las mismas que alteran su permeabilidad por lo que la célula se lisa. Sin embargo, los poros no se forman cuando una o más azúcares de la cadena de la saponina se eliminan, perdiendo así su actividad microbiciada (Cowan, 1999).

2.4.2.3. Terpenos-Esteroides

Los terpenos o isoprenoides constituyen uno de los grupos más numerosos e importantes de metabolitos secundarios (más de 40 000), distribuidos ampliamente en el reino vegetal (Azcon-Bieto y Talón, 2008; Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Generalmente son insolubles en agua y derivan de una unidad de 5 carbonos que se repite, denominada isopreno (Ávalos y Pérez-Urria, 2009), el cual no existe de manera libre en la naturaleza, no obstante, su equivalente es el isopreno activo denominado isopentenil-pirofosfato (IPP) o su isómero, el dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP), que derivan del acetil CoA vía ácido mevalónico que se produce en el citoplasma, o bien de la ruta DOXP, ubicada en los plastos (Pacheco Leal, 2001; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Castillo y Martínez, 2007).

Los terpenos de bajo peso molecular se caracterizan por ser los principales componentes de los aceites esenciales responsables de las fragancias naturales de flores, frutas, hojas y tallos, mientras que los de elevado peso molecular como el hule forma una cubierta protectora cuando las hojas y tallos son lesionados (Pacheco Leal, 2001).

Se clasifican, de acuerdo al número de isopreno de que se componen: monoterpenos (2 unidades); sesquiterpenos (3 unidades); diterpenos (4 unidades); triterpenos (6 unidades); tetraterpenos (8 unidades) y politerpenos (más de 8 unidades) (Lock de Ugaz, 2000; Kuklinski, 2003; Azcon-Bieto y Talón, 2008). Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se sintetizan principalmente por la ruta del ácido mevalónico mientras que el resto de terpenos lo hace en el plasto (Sepúlveda-Jiménez, 2003; Castillo y Martínez, 2007). A continuación se describen algunos de ellos:

Monoterpenos. Son compuestos de 10 carbonos donde la mayoría presenta funciones oxigenadas, como aldehídos o alcoholes, y son constituyentes de los aceites esenciales obtenidos de hojas, raíces, corteza y flores de diversas plantas (Lock de Ugaz, 2000; Castillo y Martínez, 2007; Azcon-Bieto y Talón, 2008). Poseen una importante actividad biológica en las plantas, puesto que algunos de ellos tienen efecto repelente contra insectos, dando así una respuesta de defensa; así como otros que pueden atraer a insectos y otros animales que ayudan a la polinización. Ejemplos de monoterpenos con actividad antimicrobiana son el mentol y el limoneno, los cuales se encuentran en los aceites de menta y limón respectivamente (figura 11) (Sepúlveda-Jiménez, 2003; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Estudios sobre los componentes químicos del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. indicaron la presencia de limoneno (figura 11B), β -linalol, decanal y 2(10)-pineno, con actividad antimicrobiana del aceite frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 y *Staphylococcus epidermidis* cepa clínica, mientras que no hubo efecto contra las cepas clínicas *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Juárez *et al.*, 2010). Además en el aceite de eucalipto (*Eucalyptus* L'Her'.) se han encontrado eucaliptol y pineno, importantes por su eficacia antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli* (Argote-Vega *et al.*, 2017).

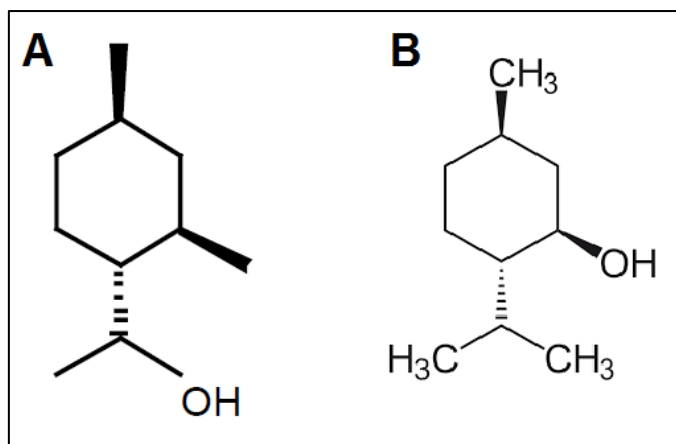


Figura 11. Estructura química de monoterpenos. A) mentol; B) limoneno. Fuente: Sepúlveda-Jiménez, 2003; Ávalos y Pérez-Urria, 2009.

Sesquiterpenos: Son estructuras con 15 átomos de carbono, cíclicas (monocíclicas, bicíclicas, tricíclicas, tetracíclicas) o acíclicas, saturadas o con dobles enlaces aislados. Varios de ellos tienen funciones hidroxilo, cetona y carboxilo, entre otras. Por lo general, son compuestos lipófilos y volátiles, y pueden obtenerse por destilación como componentes de los aceites esenciales (Kuklinski, 2003; Castillo y Martínez, 2007; Azcon-Bieto y Talón, 2008). Están presentes principalmente en las familias Labiatae, Mirtaceae, Asteraceae y Rutaceae aunque pueden observarse en miembros de otras familias (Castillo y Martínez, 2007). Algunos sesquiterpenos como la risitina y lubimina de la papa (*Solanum tuberosum* L.), el capsidiol del chile (*Capsicum annuum* L.) (figura 12) y el 2,7-dihidroxicadaleno del algodón (*Gossypium hirsutum* L.) son compuestos con actividad antimicrobiana (Sepúlveda-Jiménez, 2003; Alcantar-Aguirre, 2005).

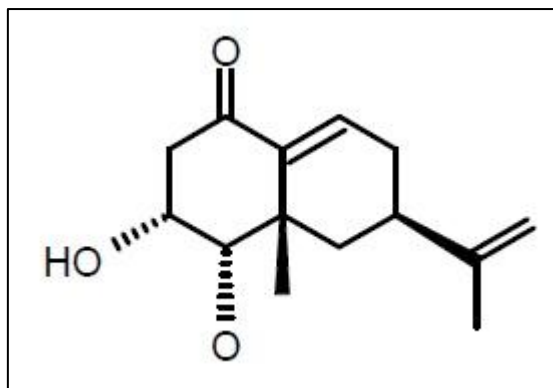


Figura 12. Estructura del capsidiol. Fuente: Alcantar-Aguirre, 2005.

Las propiedades antimicrobianas de *Salvia officinalis* L., se deben gracias a la presencia de 44 terpenoides, donde las fracciones F1 a F4 se componían principalmente por monoterpenos, mientras que la fracción F5 contenía sesquiterpenos, los cuales demostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis*, sin embargo, *S. aureus* y *S. faecalis* demostraron una menor susceptibilidad a la fracción F5 de terpenos (Mitić-Ćulafić *et al.*, 2005).

Diterpenos. Son un grupo de compuestos de 20 carbonos, pueden ser lineales o cíclicos (Kuklinski, 2003) que pueden presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos, siendo estos últimos conocidos desde tiempo atrás como ácidos resínicos, como los abiético y agático obtenidos como componentes de las oleorresinas exudadas por cortes en los troncos de pinos y abetos (gimnospermas) (Lock de Ugaz, 2000; Azcon-Bieto y Talón, 2008). Son especialmente abundantes en los órdenes Lamiales y Asterales aunque también se encuentran en Gentianales, Geraniales y Fabales (Kuklinski, 2003; Castillo y Martínez, 2007).

El diterpeno de núcleo kaurano (figura 13), aislado de tres plantas (*Pleurothyrium cinereum* van der Werff, *Esenbeckia alata* Karst & Triana y *Raputia heptaphylla* Pittier), presenta un efecto inhibitorio sobre *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis* (Cuca-Suárez *et al.*, 2011).

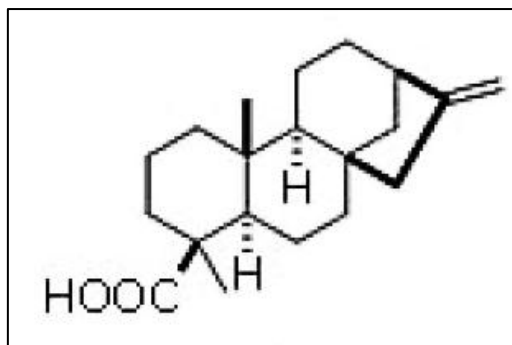


Figura 13. Estructura química del núcleo kaurano. Fuente: Cuca-Suárez *et al.*, 2011.

Triterpenos. Se estructuran por 30 átomos de carbono y por lo general son tetra o pentacíclicos, entre los triterpenos se encuentran los esteroides y esteroles, derivados del escualeno, que han perdido al menos 3 átomos de carbono (Castillo y Martínez, 2007; Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Están extensamente distribuidos en el reino vegetal, y figuran entre los terpenos más relevantes debido a que desempeñan importantes funciones fisiológicas en las plantas, y algunos tienen un gran interés farmacológico (Azcon-Bieto y Talón, 2008).

El ácido lántico (figura 14) es un triterpenoide aislado de *Lantana camara* L. que ha demostrado actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* (Saleh *et al.*, 1999).

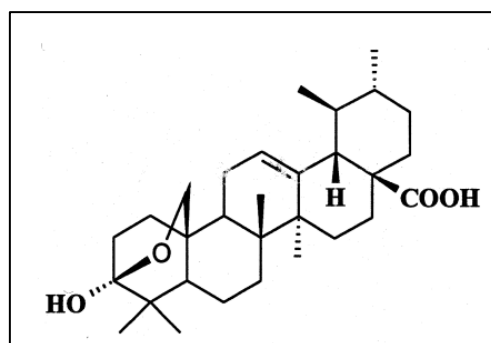


Figura 14. Estructura química del ácido lántico. Fuente: Saleh *et al.*, 1999

Los esteroides que contienen un grupo alcohol se denominan esteroles, siendo el estigmasterol y el sitosterol los más abundantes en las plantas, donde el

sitosterol difiere del estigmasterol únicamente en la ausencia del doble enlace entre los C 22 y C 23. Los esteroides en plantas tienen la función de formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y estabilidad. Algunos esteroides poseen funciones protectoras frente a insectos como en el caso de la ecdisona aislada del helecho común (Ávalos y Pérez-Urria, 2009); y el ergosterol, el cual es el esteroide más abundante es de vital importancia por ser provitamina D cuando se expone a la luz solar (Pacheco Leal, 2001).

Tetraterpenos. Son denominados con frecuencia carotenoides, lo cuales son octaprenos, formados por dos unidades de geranyl-geraniol-pirofosfato, es decir, poseen una cadena de 40 carbonos simétrica, además de un gran número de dobles enlaces conjugados, lo que justifica el intenso color que suele caracterizarlos (amarillos o rojos) (Kuklinski, 2003; Castillo y Martínez, 2007).

Politerpenos. También llamados poliisoprenoides, son el resultado de la combinación de millares de moléculas de isopreno. Dentro de este tipo de compuestos destacan el caucho del árbol *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. y la gutapercha obtenida del tronco de *Palaquium gutta* (Hook.) Burck, utilizada para realizar obstrucciones dentales y la goma de mascar (Kuklinski, 2003; Castillo y Martínez, 2007; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

El mecanismo de acción de los terpenos frente a bacterias no se comprende completamente, pero se especula que se involucra la ruptura de la membrana por los compuestos lipofílicos (Cowan, 1999).

Lactonas Sesquiterpénicas

Son una clase de sesquiterpenoides de origen vegetal, que poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono, que derivan de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metilbutadieno-1,3), cabeza-cola, contienen un anillo lactónico en su estructura, y provienen biogénicamente del farnesil difosfato (Gómez-Barrera, 2010; Sánchez-Pérez, 2014), un ejemplo es el mirellenólido (figura 15).

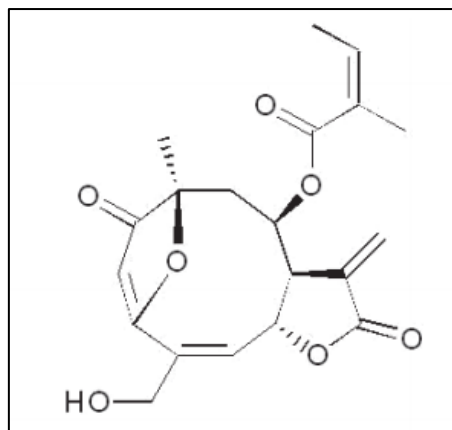


Figura 15. Estructura del millerenólido. Fuente: Dupuy *et al.*, 2008.

Son compuestos activos que se hallan principalmente en la familia Asteraceae, no obstante, se han encontrado en algunas plantas de las familias Magnoliaceae, Umbelliferae y Lauraceae (Ramos *et al.*, 1998; Kuklinski, 2003; Gómez-Barrera, 2010; Sánchez-Pérez, 2014).

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se han reportado más de 3 000 sesquiterpenlactonas diferentes (Gómez-Barrera, 2010; Sánchez-Pérez, 2014), que pueden llegar a ser muy tóxicas (Ramos *et al.*, 1998).

Son sustancias amargas que suelen encontrarse en todas las estructuras de la planta, la concentración de varía entre el 0.01 y el 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores en hojas y partes floridas; son solubles en etanol y metanol caliente, son muy solubles en cloroformo, diclorometano y éter etílico; y por lo general se les puede encontrar en forma libre y raramente en forma glicosídica (Lock de Ugaz, 2000; Gómez-Barrera, 2010; Sánchez-Pérez, 2014).

Han sido farmacológicamente poco estudiadas, sin embargo se han reportado en estudios sobre plantas consideradas como medicinales, que indican la probabilidad de la acción farmacológica, pues han demostrado acción antibacteriana, citotóxica, antitumoral y analgésica, entre otras (Lock de Ugaz, 2000; Gómez-Barrera, 2010).

Su mecanismo exacto de toxicidad no es conocido, aunque se cree que tendrían una capacidad alquilante, uniéndose a grupos nucleofílicos como los sulfhidrilo y amino de las proteínas (Ramos *et al.*, 1998).

La Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009b) reporta que una fracción de alcaloides y de lactonas sesquiterpénicas obtenidas de las partes aéreas de *Solanum nigrum* L. presentó actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

2.5. El crustáceo *Artemia salina*

2.5.1. Generalidades

Es un organismo propio de aguas salobres e hipersalinas de todo el mundo (figura 16). Es utilizado como alimento de los estadios post-larvarios de muchas especies de peces y crustáceos marinos y forma parte de las aguas continentales salobres del planeta (Castro-Alvarenga y Cordova-Flamenco, 2003).



Figura 16. Larva de *Artemia salina* vista al microscopio óptico aumento de 10x. Fotografía: Julio Burguete (2017).

Las poblaciones de *Artemia* se encuentran distribuidas en más de 300 lagos salinos naturales o salinas de construcción artificial a lo largo de todo el mundo. Diferentes cepas geográficas se han adaptado a condiciones que fluctúan dentro de un amplio margen de temperatura (6–35°C) y composición iónica del biotopo (aguas ricas en cloruros, sulfatos y carbonatos) (Chaiña-Becerra, 2015) y es por esto que se asegura que estos animales poseen el sistema osmoregulatorio más eficiente en todo el reino animal, además son capaces de sintetizar eficazmente pigmentos

respiratorios (hemoglobina) logrando con esto hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disueltos en ambientes hipersalinos. Estos crustáceos tienen la capacidad de producir quistes en fase de latencia, cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie (Castro-Alvarenga y Cordova-Flamenco, 2003).

Es un filtrador no selectivo y se alimenta tanto de materia orgánica particulada (ej. detritos biológicos procedentes de aguas de manglares) como de organismos vivos de tamaño apropiado (microalgas y bacterias). La reproducción ovovivípara (puesta de nauplios) se da principalmente en bajas concentraciones de sal, mientras que los quistes (reproducción ovípara) en ambientes salinos superiores al 150% (Chaiña-Becerra, 2015).

2.5.2. Ubicación taxonómica (Blanco-Sierra y Lainez-Zelayaa, 2002; Chaiña-Becerra, 2015)

Phyllum: Artropoda

Clase: Crustacea

Subclase: Branquiopoda

Orden: Anostraca

Familia: Artemiidae

Género: *Artemia*, Leach 1819

El nombre específico *Artemia salina* no es taxonómicamente válido en la actualidad. Experiencias de cruzamiento entre diferentes poblaciones de *Artemia* han demostrado el aislamiento reproductivo de algunos grupos poblacionales. Y esto ha llevado al reconocimiento de especies hermanas a las que se les han dado nombres diferentes (Blanco-Sierra y Lainez-Zelaya, 2002).

2.5.3. Ciclo de vida (Castro-Alvarenga y Cordova-Flamenco, 2003)

Cistos. Es un huevecillo de aproximadamente 200-300 micras de diámetro; puede mantenerse inactivo por algún tiempo hasta estar en condiciones óptimas. Una vez puesto en agua de mar, los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo interrumpido. Tras unas 24 horas, la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión.

Nauplios. Inmediatamente después de la ruptura de la membrana (eclosión) sale el nauplio el cual mide aproximadamente de 0.4 a 0.5 mm y pesa aproximadamente de 0.002 a 0.003 mg.

Juveniles. Son larvas pequeñas que miden aproximadamente de 2-4 mm, las cuales nadan libremente. Poseen un tracto digestivo funcional, un abdomen alargado y muchos apéndices bien diferenciados.

Adultos. Estos miden de 8-10 mm y presentan once pares de teracópodos muy bien diferenciados con antenuelas sensoriales, un par de ojos laterales y tracto digestivo completo.

La importancia de este organismo radica en que a partir de 1992 se realizaron bioensayos con larvas de *A. salina*, que son sensibles a gran variedad de sustancias y que fácilmente pueden medir la actividad biológica en cuanto a la citotoxicidad de extractos vegetales. Tiene varias características que la hacen ideal para realizar bioensayos, es decir, fácil manejo, porque mantiene un estado latente en forma de cistos (huevecillos) secos los cuales pueden ser fácilmente almacenados, transportados, etc. (*Ídem*).

III. ANTECEDENTES

Los reportes de investigación acerca de los efectos de *T. stans* sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas se describen a continuación.

Dewangan *et al.* (2017), llevaron a cabo estudios antimicrobianos y antifúngicos de los extractos de hojas secas con los solventes etanol, cloroformo y agua durante una semana. Realizaron las pruebas antimicrobianas por el método de difusión en agar descrito por Bauer (1966), donde los tres extractos fueron probados a concentraciones de 0.4 mg/mL ante *Pseudomonas aeruginosa* y *Aspergillus niger*, incubaron la bacteria a 37°C por 24 h y el hongo a 30°C por tres días. Transcurrido este tiempo observaron y midieron el diámetro de las zonas de inhibición. La zona de inhibición de *T. stans* sobre *P. aeruginosa* fue de 12, 18 y 15 mm con los extractos acuoso, etanólico y de cloroformo respectivamente; mientras que para *A. niger* fue de 11, 16 y 14 mm de manera respectiva con los solventes ya mencionados.

Kumar (2017) evaluó los extractos acuosos y metanólicos de hojas de *T. stans* como posible antibacteriano contra el crecimiento de algunas cepas bacterianas utilizando el método de difusión en agar. Las hojas secas las extrajo con 360 mL de metanol al 80% y 360 mL de agua. Ambos extractos mostraron un efecto significativo contra las bacterias *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*. La mayor actividad inhibitoria fue la del extracto metanólico, dado que el acuoso mostró una menor zona de inhibición frente a *Micrococcus luteus*. El efecto inhibitor del extracto metanólico de hojas fue de 12.10 mm contra *Escherichia coli*, de 10.20 mm frente a *Bacillus subtilis* y 8.35 mm para *Staphylococcus aureus*. Además realizó un análisis fitoquímico, el cual reveló la presencia de saponinas, alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides, compuestos fenólicos y glucósidos en los extractos metanólicos, mientras que los taninos, esteroides y glicósidos estuvieron ausentes en el extracto acuoso.

Boopathi *et al.* (2017) evaluaron la actividad antimicrobiana de hojas secas de *T. stans* y *Muntingia calabura* por el método de difusión en disco. La actividad de los

extractos fue estudiada en las concentraciones 62.5, 125, 250, 500 y 1 000 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* MTCC 96, *Streptomyces filvissimus* MTCC 7336, *Bacillus subtilis* MTCC 736, *Escherichia coli* MTCC 1687, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2488, *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162, *Proteus mirabilis* MTCC 9242 y *Shigella flexneri* MTCC 1457. La extracción se realizó con éter de petróleo y etanol, con 100 g de polvo de hojas secas, utilizando un extractor Soxhlet.

Se impregnaron discos de 6 mm de diámetro con 10 µL de 100 mg/mL (1 mg/disco) de los extractos, el control positivo fue Oxitetraciclina (10 µL/disco). Las placas de agar fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Los resultados indicaron que los extractos etanólicos de *T. stans* poseen actividad antibacteriana contra todos los organismos probados con las concentraciones mayores, donde las zonas de inhibición midieron de 10-21 mm, haciendo hincapié en las medidas frente a *S. aureus* (17 mm), *B. subtilis* (21 mm), *E. coli* (14 mm) y *P. aeruginosa* (10 mm). Los extractos de *T. stans* fueron más activos que los de *M. calabura*. Cabe mencionar que el estudio fitoquímico de los extractos de etanol y éter de petróleo, revelaron la presencia de compuestos bioactivos tales como glicósidos, alcaloides, taninos, flavonoides y saponinas para el primer caso y aceite, goma y mucílago para el segundo.

Sunitha *et al.* (2016), llevaron a cabo estudios sobre los constituyentes de *T. stans* y su efecto antimicrobiano. Molieron hojas secas y las extrajeron con éter de petróleo, cloroformo y metanol de manera separada por un lapso de seis horas; después los extractos se concentraron al vacío y se les realizó cromatografía en columna de los extractos de cloroformo y metanol que se combinaron y se colectaron fracciones de 250 mL.

Las cepas probadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus anginosus*, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans*, *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Enterobacter aerogens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Usaron el método de pozos en agar, cloranfenicol y fluconazol como control positivo para bacterias y hongos respectivamente. Se prepararon dos soluciones

madre de los extractos en concentraciones de 100 mg/mL y 300 mg/mL, de los cuales se tomaron 50 μ L para ser colocados pocillos de 6 mm. Las cajas de Petri se incubaron a 30°C por 24 horas.

El extracto metanólico mostró actividad moderada contra las bacterias Grampositivas y Gramnegativas, así como con las cepas de hongos. La actividad aumentó de acuerdo al incremento de la concentración, los diámetros de zonas de inhibición para algunos de los microorganismos fue de: *S. aureus* con 12 mm, *E. coli* con 13 mm, *P. aeruginosa* con 12 mm para la concentración de 100 mg/mL, mientras que para la concentración de 300 mg/mL fue de 14, 16 y 16 mm de acuerdo al orden anotado de las bacterias.

Anburaj *et al.* (2016), mencionan en su revisión acerca de la actividad antibacteriana de tres extractos de hojas, siendo estos de etanol, metanol y agua, las bacterias probadas fueron *Pseudomonas fluorescens*, *Clavibacter michiganensis* sub sp. *Michiganensis*, *Xanthomonas axanopodis* pv. *Malvacearum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, todas las respuestas de inhibición fueron positivas. Por otra parte, el análisis fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, fenoles, esteroides, antraquinonas y taninos.

En el 2012, López Gómez llevó a cabo estudios sobre actividad antibacteriana y determinación de grupos de metabolitos secundarios, sobre diferentes extractos de *T. stans*, siendo estos de hojas, tallos, frutos, flores y raíces secos recolectados en época de floración-fructificación. Realizó extractos con 50 g del material pulverizado con los disolventes hexano, acetato de etilo y metanol en un equipo de Soxhlet. Para las pruebas antibacterianas empleó Bauer *et al.* (1996) con extractos en concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg. Las bacterias probadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), *S. Typhi* (ATCC 6539), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228) y *E. coli* enterohemorrágica. Los MS los identificó por pruebas colorimétricas.

Todos los extractos inhibieron a las bacterias Gramnegativas, excepto a *E. coli* enterohemorrágica, y la mayor inhibición fue en *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los extractos de metanol de hojas inhibieron a *E. coli*, *S. sonnei*, *S. Typhi*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, cuyos diámetros variaron de 7 a 14 mm, siendo *S. aureus* la más susceptible (14.3 mm), seguida de *E. coli* (12.6 mm) a la más alta concentración. El extracto metanólico de tallos fue activo frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, con medidas de 8 a 13 mm. Los MS encontrados en los extractos metanólicos de hojas y tallos fueron fenoles, taninos condensados y acaloides para el primer caso, y glucósidos, taninos condensados, fenoles y flavonoides (flavona) para el segundo.

En el 2012, Al-Azzawi *et al.*, realizaron ensayos bacteriológicos para determinar el efecto antibacteriano de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de hojas secas de *T. stans*. Colocaron 50 g de hojas pulverizadas en contenedores por 72 h a 25°C, agitándolo ocasionalmente y protegiéndolo de la luz. Después filtraron el solvente para posteriormente someterlo a un rotaevaporador para recuperar el extracto deseado. Estos fueron probados frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6623) usando el método de difusión en agar y usando concentraciones de 0.025, 0.050 y 0.1 mg de extracto. El extracto etanólico demostró tener actividad antibacteriana contra *B. subtilis* que fue inhibido por las tres concentraciones con zonas sin crecimiento de 5 a 15 mm. El extracto acuoso no tuvo actividad antibacteriana contra los microorganismos probados.

Govindappa *et al.* (2011), realizaron estudios sobre la capacidad antibacteriana de los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de *T. stans*, las bacterias probadas fueron *Pseudomonas fluorescens*, *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis*, *Xanthomonas axanopodis* pv. *malvacearum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, así como de la capacidad antifúngica contra especies de *Aspergillus* y *Alternaria*. Las plantas fueron secadas a temperatura ambiente por cuatro semanas, después fueron molidas para obtener un polvo, del cual tomaron 100 g para ser extraídos con 200

mL agua destilada, etanol y metanol (60°C para los primeros y 80°C para el último), de manera separada por dos días en agitación. Hicieron uso del método de difusión en disco descrito por Lai *et al.* (2009) y Adedapo *et al.* (2008). El inóculo utilizado fue de 1×10^8 CFU/mL y se propagó en placas de agar nutritivo. Los extractos de la planta fueron disueltos con el solvente correspondiente a una concentración final de 10 mg/mL. Los discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron impregnados con 1 mg del extracto. La incubación fue a 37°C por 24 h. El control positivo fue el antibiótico cloranfenicol (10 µg) utilizando discos. El experimento se realizó por triplicado para obtener la media de estos.

Los resultados indicaron zonas de inhibición producidas por los extractos etanólico, metanólico y acuoso, donde *E. coli* fue la más susceptible al extracto metanólico (15 mm), y en el etanólico con 14 mm; *P. aeruginosa* presentó halos de inhibición de 10, 9 y 6 mm de manera respectiva a los extractos metanólicos, etanólicos y acuosos; por otra parte *S. aureus* presentó las medidas de inhibición con valores de 11, 11 y 2 mm en el mismo orden de extractos. Respecto al perfil fitoquímico para taninos, flavonoides, fenoles, alcaloides, esteroides, antraquinonas y saponinas, todas se encontraron en todos los extractos, sin embargo los extractos etanólicos y metanólicos presentaron mayor cantidad de estos compuestos que el acuoso.

Senthilkumar *et al.* (2010), evaluaron la actividad de los extractos acuosos de hojas secas de tres plantas, entre ellas *T. stans* frente a cinco bacterias patógenas humanas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio parahemolyticus*. Hicieron uso de 10 g del polvo de cada planta, agregando agua destilada y calentando por dos horas para realizar el método de decocción. Posteriormente filtraron a través de ocho capas de tela de muselina y centrifugaron a 5 000 g por 10 minutos, recolectando el sobrenadante. El procedimiento se repitió dos veces. El ensayo antibacteriano se realizó con el método de difusión de discos sobre agar Müller-Hinton. Utilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro los cuales fueron impregnados con 20 µL del extracto de forma aséptica, realizado por triplicado. Todas las bacterias fueron susceptibles a los

extractos pero las Gramnegativas fueron mayormente inhibidas que las Grampositivas. Las hojas tuvieron un amplio espectro de actividad antibacteriana. El promedio de las zonas de inhibición del extracto de hojas de *T. stans* para *S. epidermidis* fue de 7 mm, para *S. Typhi* de 10 mm, *K. pneumoniae* con 8 mm, *V. parahemolyticus* con 7 mm, sin embargo sobre *S. aureus* no hubo halo de inhibición.

Ibarra *et al.* (2009), realizaron estudios acerca del perfil fitoquímico de *T. stans* a partir de las hojas secas de la planta, con tres solventes diferentes: agua, hexano y etanol. Para el extracto acuoso se utilizaron 50 g del material seco y molido, preparando una infusión en agua, reposando 20 minutos y filtrando con un papel filtro Whatman No. 40 en un matraz kitasato y con ayuda de una bomba de vacío, posteriormente el sobrenadante fue colocado en viales para liofilizadora y congeladas a -21°C por 12 horas y después a -70°C para su liofilización. Para el extracto hexánico emplearon 50 g de la planta seca y molida, con 250 mL de hexano en un matraz EM y agitando por 48 h. Se filtró y se dejó evaporar a 37°C por tres días. Para el extracto etanólico fue el mismo procedimiento que el anterior pero con etanol, dejándose en agitación por 72 horas.

Las pruebas fitoquímicas de cada extracto se realizaron de acuerdo a Domínguez (1979). En los tres extractos se encontraron alcaloides, coumarinas, flavonoides y sesquiterpenlactonas. Los esteroides, metilesteroides y saponinas en los extractos hexánico y etanólico. Las insaturaciones se observaron en los extractos acuoso y etanólico. Los azúcares solo estuvieron presentes en el extracto acuoso.

IV. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar el efecto biológico de los metabolitos secundarios de extractos etanólicos y metanólicos de diferentes estructuras deshidratadas de *T. stans* sobre el crustáceo *Artemia salina* y bacterias Gramnegativas y Grampositivas.

4.2. Particulares

- Determinar la actividad antibacteriana y las concentraciones inhibitoria mínima y bactericida mínima de los extractos de hojas, cortezas de tallos y cortezas secas de *T. stans* sobre las bacterias Gramnegativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) y los patotipos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Salmonella Typhi* (ATCC 6539), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y las Grampositivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) y *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615).
- Identificar los grupos de metabolitos secundarios utilizando pruebas colorimétricas y de precipitación.
- Conocer la toxicidad de los extractos de *T. stans* frente al crustáceo *Artemia salina*.

V. ZONA DE RECOLECTA

Tuxtla Gutiérrez es la ciudad capital del estado de Chiapas, se ubica entre los paralelos $16^{\circ}38'$ y $16^{\circ}51'$ de latitud norte; los meridianos $93^{\circ}02'$ y $93^{\circ}15'$ de longitud oeste y a una altitud de 540 msnm. Colinda al norte con los municipios de San Fernando, Osumacinta y Chiapa de Corzo; al este con el municipio de Chiapa de Corzo y Suchiapa; al sur con el municipio de Suchiapa; al oeste con los municipios de Suchiapa, Ocozocoautla de Espinosa, Berriozábal y San Fernando (Honorable Ayuntamiento Municipal, 1988; Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2010).

La recolecta se realizó en la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, localizado en la zona Norte-Poniente de Tuxtla Gutiérrez, en las coordenadas $16^{\circ}46'35.2''$ latitud Norte y $93^{\circ}07'8.5''$ longitud Oeste a una altura de 588 metros sobre el nivel del mar (figura 17).

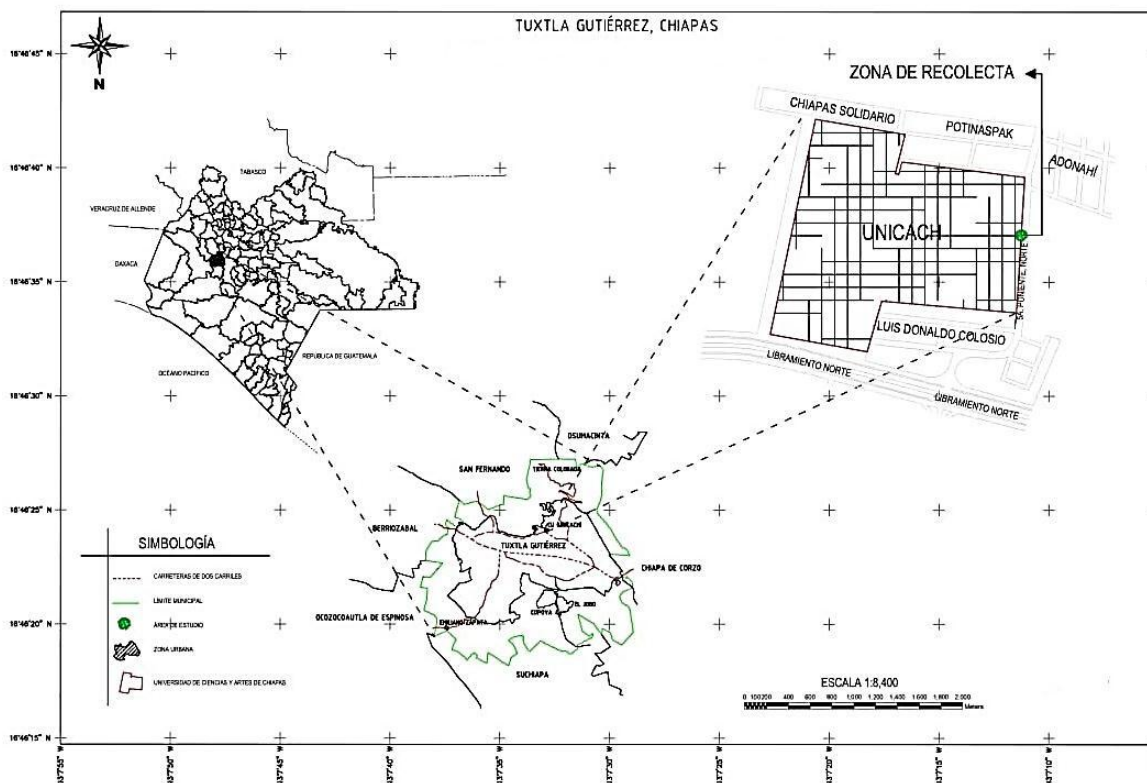


Figura 17. Localización de la zona de recolecta. Realizado por: Ing. Antonio de Jesús Alfaro Hernández (2019).

Clima

Es cálido subhúmedo con lluvias en verano, menos húmedo (99.97%) y cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (0.03%), con un rango de temperatura de 20 a 28°C y una precipitación anual que va de los 800 a los 1 200 mm (INEGI, 2010). El clima y las precipitaciones pluviales del municipio varían de acuerdo con la altura del lugar y su situación forestal. Tal es el caso de las colonias el Jobo, el Zapotal, Copoya o Cerro Hueco, donde la humedad del ambiente es mayor, y tanto su altura sobre el nivel del mar como su vegetación, contribuyen a tener un clima fresco y agradable (Honorable Ayuntamiento Municipal, 1988).

Fisiografía

El municipio forma parte de las regiones de la Depresión Central y Altos de Chiapas en un 68.22 y 31.78% respectivamente (INEGI, 2010).

Hidrología

La hidrología municipal se compone de arroyos entre los cuales el más importante es el conocido Río Sabinal (Honorable Ayuntamiento Municipal, 1988), y debido al declive que existe hacia este, el terreno es relativamente plano (Anónimo, 2019).

Vegetación

La vegetación original es de de Selva Baja Caducifolia, caracterizada por la menor talla de sus componentes arbóreos (8-15 m) y donde casi la totalidad de los árboles y arbustos pierden sus hojas en la época seca, sin embargo, la explosión demográfica, deforestación, expansión de de barrios y colonias, así como las diversas zonas de desarrollo urbano y de recreación en la ciudad, han afectado seriamente a la vegetación, de tal manera que los cerros aledaños están casi desprovistos totalmente de su vegetación primaria (Honorable Ayuntamiento Municipal, 1988).

VI. MÉTODO

6.1. Recolecta de las muestras vegetales

Se recolectaron hojas, cortezas de tallos y cortezas de *T. stans* en el mes de mayo de 2018 en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas cuando la planta estaba en etapa vegetativa. Las estructuras se trasladaron al Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. El material recolectado se revisó minuciosamente y se eliminaron partes manchadas o enfermas de la planta, se eliminó el polvo y cortó en fragmentos pequeños. El material vegetal se dejó secar a la sombra y temperatura ambiente, y posteriormente se molió hasta obtener un polvo fino (aproximadamente 50 g de cada estructura).

También se recolectaron ejemplares de herbario que se secaron, prensaron, identificaron y se depositaron en el Herbario Eizi Matuda (HEM) del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH, lugar en donde corroboraron la identificación taxonómica de la especie.

6.2. Obtención de los extractos

Los extractos se obtuvieron con etanol y metanol (Baker®) empleando el método de maceración con agitación ocasional, durante 48 horas cada vez, realizando tres repeticiones para cada disolvente. Para ello se pesaron 50 g de cada estructura vegetal seca y molida, y se añadieron 350 mL de disolvente (1:7). El extracto se filtró para eliminar los residuos y poder ser concentrado a presión reducida en un evaporador rotatorio marca Heidolph® VV2000 a 120 rpm a temperaturas de 78°C para el etanol y de 65°C para el metanol. Una vez que se evaporó el disolvente se depositaron en frascos limpios, previamente pesados y etiquetados, para permitir que el disolvente se terminara de evaporar a temperatura ambiente (diagrama 1).

Cada extracto obtenido se pesó en una balanza analítica marca Ohaus®, y por diferencia de pesos se obtuvo el rendimiento (%) de cada uno.

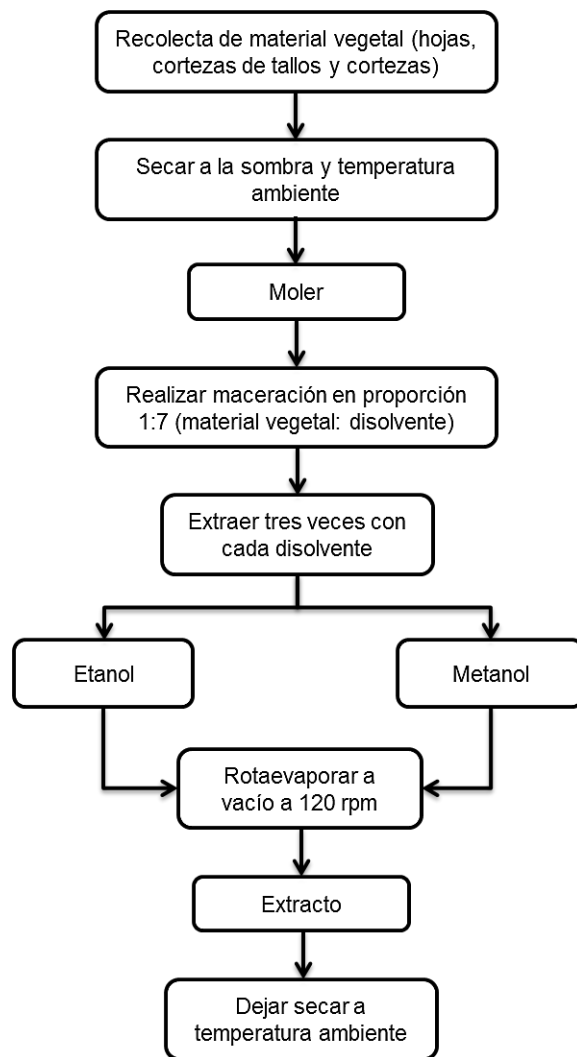


Diagrama 1. Preparación de los extractos.

6.3. Ensayos antibacterianos

6.3.1. Bacterias

Las bacterias frente a las que se evaluaron los extractos fueron las Gramnegativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), y los patotipos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Salmonella* Typhi (ATCC 6539), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y las Grampositivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) y *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615).

6.3.2. Preparación del inóculo

Las bacterias se reactivaron sembrando en caldo nutritivo e incubaron a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas. Se realizó una tinción para corroborar el tipo de Gram, se revisó la morfología colonial y se realizaron pruebas bioquímicas con el sistema API 20E (Biomériux®). Una vez corroborada la identidad de la cepa, se mantuvo en agar soya tripticaseína inclinado.

Para preparar el inóculo de cada cepa se tomaron con un asa de un cultivo de 24 h de 3 a 6 colonias aisladas con las que se realizaron cultivos en caldo Müller-Hinton (BBL®), incubando a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ de 3 a 6 horas. La turbidez de la suspensión se ajustó a 0.5 de la escala de McFarland (cerca de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/mL]), cuya densidad óptica se midió a 625 nm en un espectrofotómetro (Cona, 2002; Andrews y Howe, 2011) (diagrama 2).

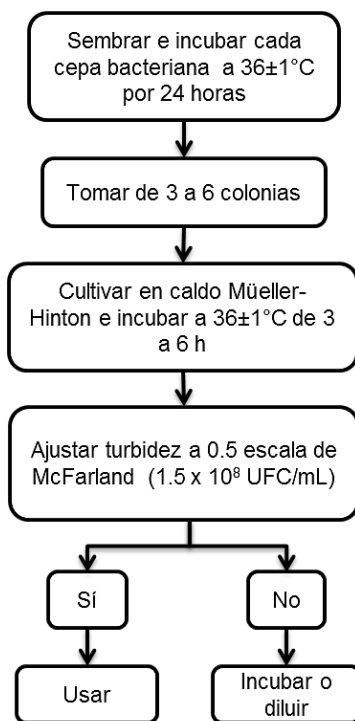


Diagrama 2. Preparación del inóculo bacteriano.

6.3.3. Concentraciones de prueba

Para las concentraciones de prueba se preparó una solución madre de 50 mg/mL de cada uno de los extractos, del cual se tomaron 50, 100 y 200 μL para obtener concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/disco (mg/d).

Se elaboraron discos de papel filtro que se esterilizaron a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. De manera aséptica, los discos se impregnaron con los extractos y concentraciones correspondientes gota a gota, esperando a que la gota secase para continuar agregando la siguiente.

6.3.4. Prueba de difusión en agar

Se inoculó cada cepa en la superficie de una caja de agar Müller-Hinton en condiciones de esterilidad, pasando el hisopo estéril de forma masiva, rotando la caja a 90° aproximadamente para asegurar su distribución homogénea. Se esperaron de 5 a 10 minutos y después con ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos impregnados con extracto en las concentraciones a evaluar (2.5, 5 y 10 mg/d) así como el disco testigo de manera equidistante sobre la circunferencia de la caja de agar (figura 18).

Las cajas inoculadas se invirtieron e incubaron a 36°C±1 durante 18 horas. La acción antibacteriana se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición en milímetros, la medida incluye el diámetro del disco. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (diagrama 3).

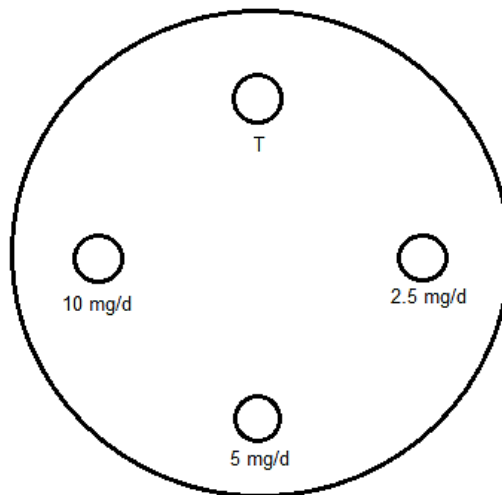


Figura 18. Distribución de los discos en la caja Petri.

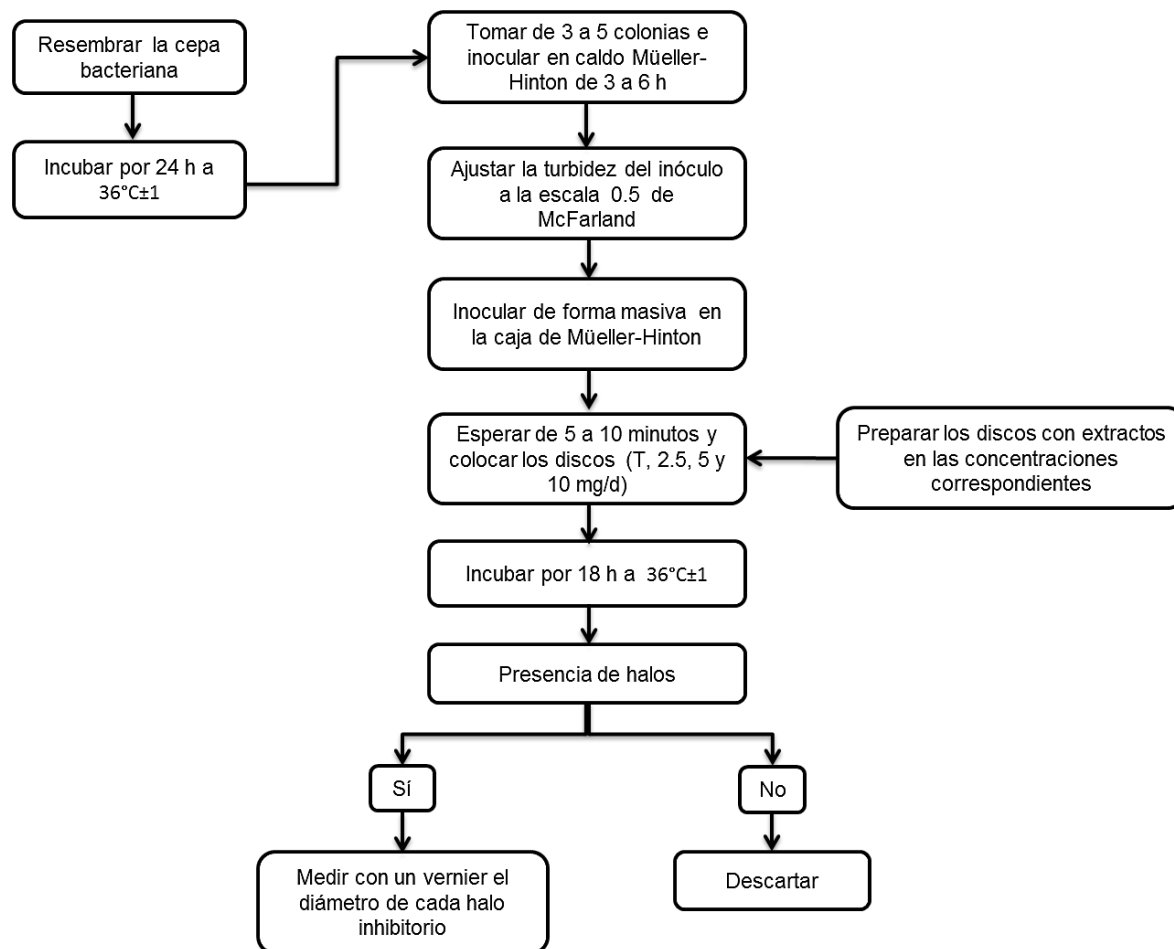


Diagrama 3. Método de difusión en placas de agar.

6.3.5. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Por el método de microdilución seriada en medio líquido (Sarker *et al.*, 2007) se determinaron los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos en estudio contra las bacterias de prueba.

Se preparó una solución madre de cada extracto empleando 96 mg de extracto disuelto en 6% de dimetilsulfóxido (60 μ L) (DMSO), y el resto con caldo Müller-Hinton (96 μ L) y se preparó una solución acuosa de resazurina (Sigma®) en concentración de 4.7 Mm.

Se prepararon placas estériles de 96 pocillos (Brandplates®) en una campana de flujo laminar de la siguiente manera: en todos los pocillos se depositaron 100 μ L de caldo Müller-Hinton y en el primer pocillo 100 μ L de la solución madre, a partir de

éste se realizaron transferencias para obtener diluciones seriadas. El último pocillo quedó con 200 μ L del cual se desecharon 100 μ L de tal manera que todos tuvieran el mismo volumen. Después se añadió a cada pocillo 10 μ L del inóculo estandarizado y 10 μ L de la solución de resazurina. Las placas se prepararon por duplicado. Las concentraciones de prueba finales fueron 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1562, 0.0781, 0.0390 y 0.0195 mg/mL (diagrama 4).

En cada ensayo se determinaron tres controles: el control positivo (Gentamicina (Sigma®)+ caldo Müeller-Hinton + bacteria + resazurina) control del crecimiento (caldo Müeller-Hinton + bacteria + resazurina) y el control de esterilidad del extracto (extracto + caldo Müeller-Hinton + resazurina [sin bacteria]).

Las placas se incubaron aeróbicamente a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ por 18 horas. Al finalizar el periodo de incubación se observó la coloración de cada pozo: el color rosa indicó crecimiento y el azul inhibición del crecimiento bacteriano, determinando entonces el valor de la CIM para cada microorganismo, el cual es definido como la menor concentración del agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento (diagrama 4).

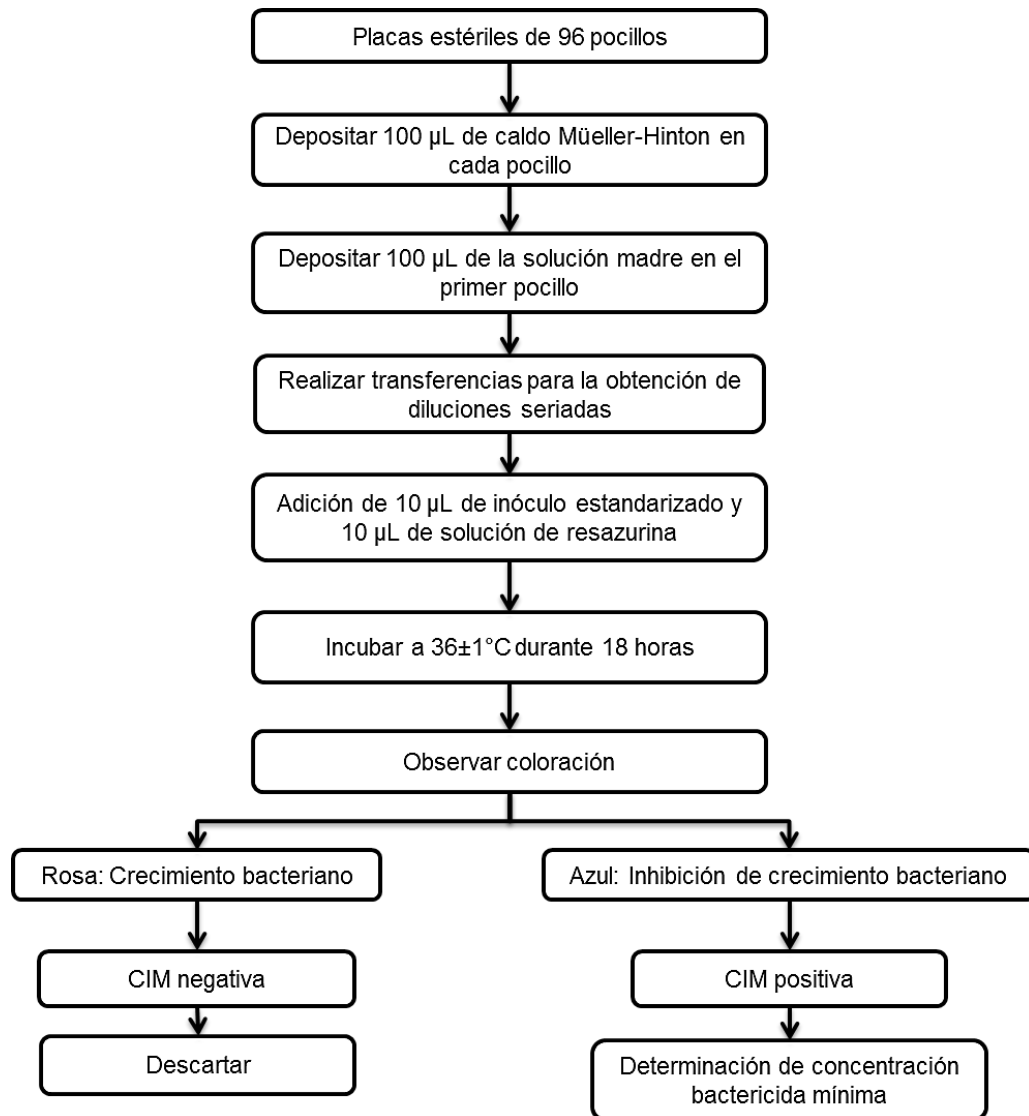


Diagrama 4. Prueba para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM).

6.3.6. Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Corresponde a la menor concentración de la sustancia capaz de inhibir totalmente el crecimiento bacteriano. Para esto, una vez determinada la CIM se tomaron 10 µL del pocillo donde no se presentó crecimiento bacteriano (corte de la CIM) más un pocillo abajo y otros dos de arriba de ésta, se inoculó en una caja Petri (35 x 10 mm) con agar soya tripticaseína e incubó por 18 horas (Zampini *et al.*, 2007). El experimento se realizó por duplicado.

Transcurrido el tiempo de incubación en aerobiosis se revisaron las cajas de Petri para observar si existió o no crecimiento bacteriano, se contó el número de colonias en el caso de que hubiera crecimiento bacteriano. La placa correspondiente a la menor concentración de extracto en la que no se observó crecimiento correspondió a la CBM. Los experimentos se realizaron por duplicado (diagrama 5). Si en la siembra de la muestra del pocillo de la CIM no se presentó crecimiento bacteriano, indicó que el extracto presentó una actividad bactericida, de lo contrario es bacteriostática.

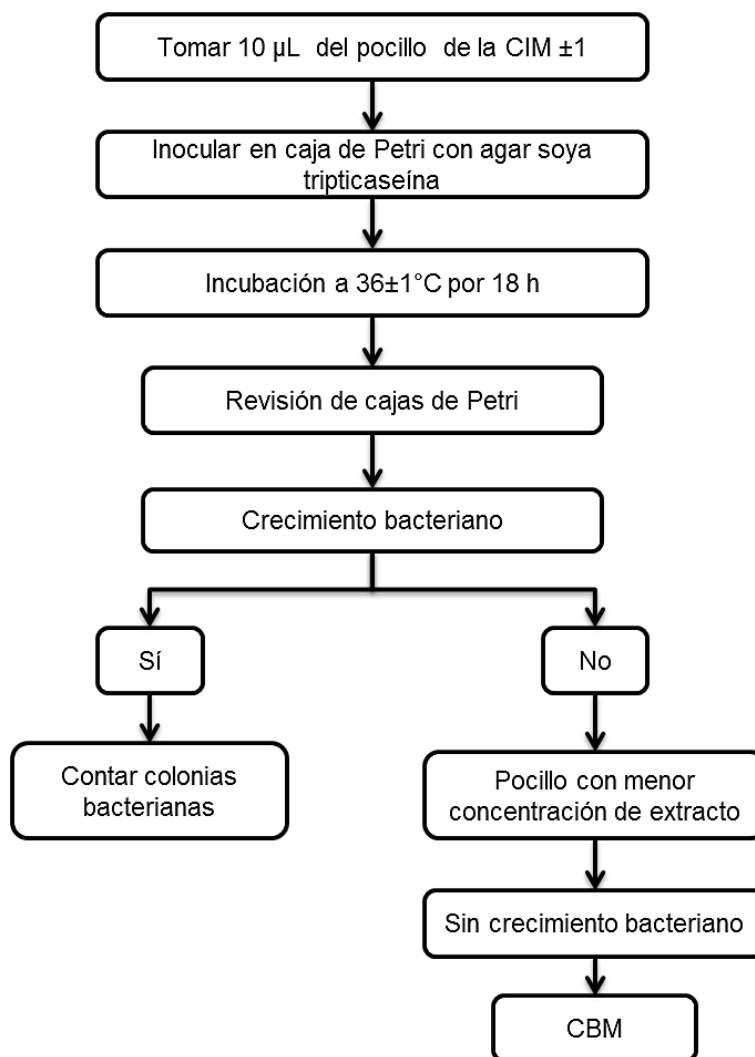


Diagrama 5. Prueba para determinar la concentración bactericida mínima (CBM).

6.4. Identificación de grupos de MS

Se preparó una solución madre de cada extracto utilizando 50 mg de cada uno de ellos y se diluyó en 10 mL del disolvente con el que se extrajo, lo que permitió obtener una concentración final de 5 mg/mL.

Después se distribuyó 1 mL de la solución anterior en 8 tubos de ensayo (una serie de tubos por cada tipo de extracto) y se evaporó el disolvente a temperatura ambiente (diagrama 7). Las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados se anotaron mediante un sistema de cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos siguiendo los criterios de: abundante (+++), media (++), ligera (+) y ausencia (-).

Para realizar el perfil fitoquímico cualitativo se realizaron las siguientes pruebas:

Alcaloides: prueba con el reactivo de Dragendorff

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL HCl al 10%, y dos gotas del reactivo de Dragendorff. Un precipitado marrón indicará la presencia de este metabolito (Domínguez, 1973).

Fenoles: prueba de cloruro férrico

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de etanol más tres gotas de FeCl_3 al 3% en etanol. La aparición de una coloración verdosa correspondería a una reacción positiva (*Ídem*).

Flavonoides: prueba de Shinoda

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de etanol más tres trocitos de magnesio y dos gotas de HCl concentrado. El desarrollo de un color naranja indicaría la presencia de flavona, color rojo para flavonona, rojo azulado para flavonol y violeta para xantinas (*Ídem*).

Glucósidos: prueba de Molish

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de etanol, luego dos gotas de alfa-naftol al 5% en etanol y 1 mL de H_2SO_4 gota a gota dejando

resbalar por las paredes del tubo. La formación de un anillo de color violeta indicaría una reacción positiva (Plummer, 1981).

Saponinas: prueba de espuma

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de agua destilada, se tapó y agitó durante 30 segundos, la aparición de espuma durante 2 minutos indicaría la presencia de saponinas (Domínguez, 1973).

Taninos: prueba para taninos hidrolizables y condensados

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de agua y dos gotas de solución acuosa de FeCl_3 al 2%. La aparición de una coloración azul indicaría que se trata de taninos hidrolizables y una coloración verde la presencia de taninos condensados (modificado de Salem *et al.*, 2013).

Terpenos: prueba de Liebermann-Buchard

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de cloroformo y 1 mL del reactivo de Liebermann-Buchard. La reacción sería positiva para esteroides si se presentaba una coloración azul o azul verde y rojo, rosa o violeta si se tratara de terpenos (Domínguez, 1973).

Lactonas sesquiterpénicas o sesquiterpenlactonas: prueba de Baljet

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de etanol y se agitó. Posteriormente se le añadió 1 mL del reactivo de Baljet. La presencia de una coloración roja (++) o precipitado color rojo (+++) indicaría una prueba positiva (Miranda-Martínez, 2002).

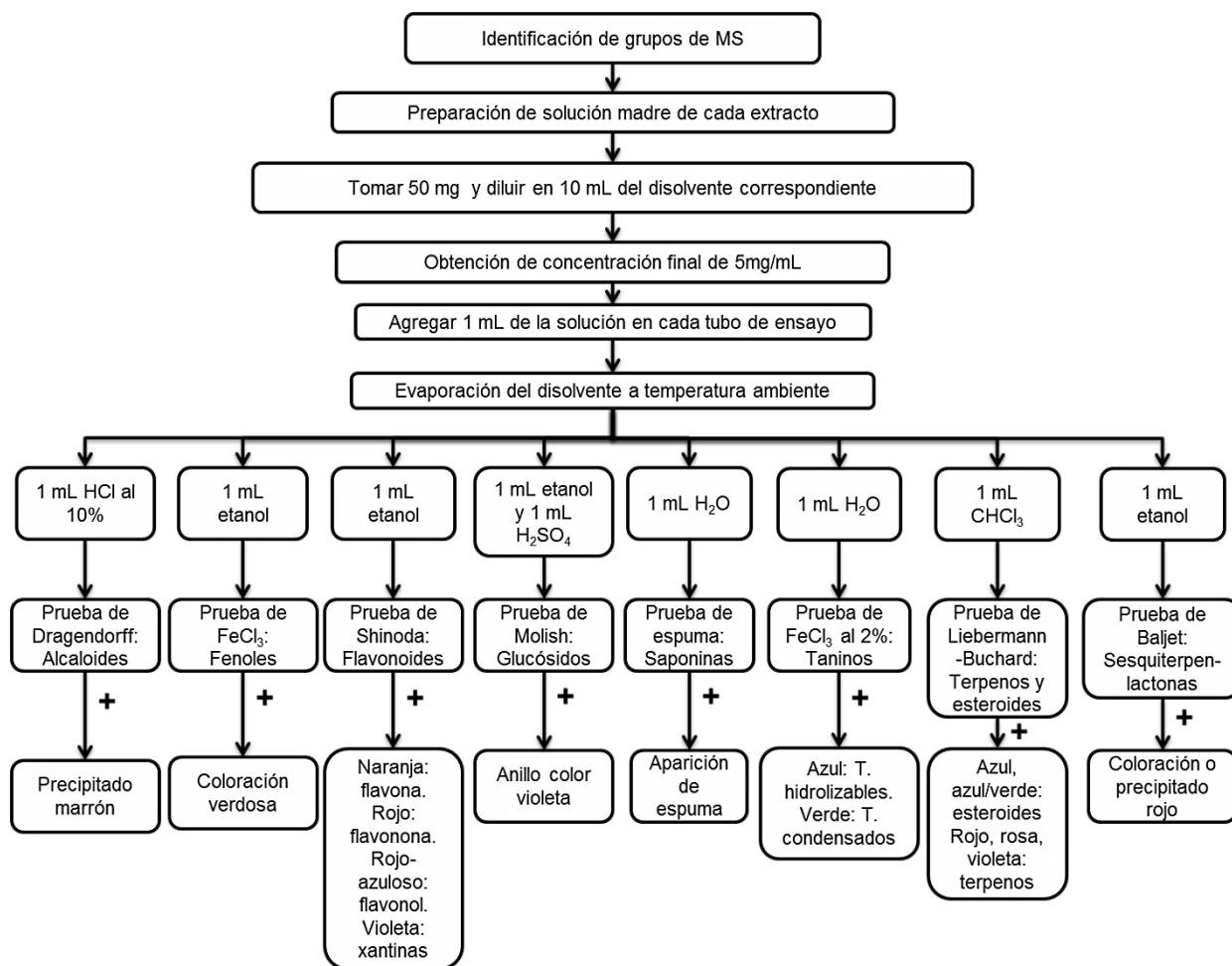


Diagrama 6. Pruebas para la determinación de grupos de metabolitos secundarios.

6.5. Toxicidad de los extractos sobre *Artemia salina*

Esta prueba se realizó a los extractos que fueron activos frente a las bacterias evaluadas. Para determinar la toxicidad de los extractos crudos, se empleó el bioensayo de *A. salina* siguiendo el método propuesto por McLaughlin *et al.* (1998). Para ello se construyó una pecera con agua salina a temperatura ambiente dividida en dos partes, una totalmente oscura en la que se colocaron 50 mg de quistes de *A. salina* y la otra descubierta, con previa oxigenación de dos horas con una bomba para pecera, con luz continua. Las larvas se recolectaron, añadiendo 10 de estas en cada vial preparado con antelación.

Los viales de prueba se prepararon disolviendo 10 mg de extracto en 1 mL de agua destilada (10 mg/mL), posteriormente se transfirieron a tubos en concentraciones de 500, 50 y 5 μ L. Después se añadieron 5 mL de agua salina y se depositaron 10 larvas del crustáceo en cada uno de los viales (eclosión de 24 horas) y se añadió como alimento una gota de solución de levadura (0.6 mg/mL) previamente disuelta en agua salina. Con esto se obtuvieron las siguientes concentraciones: 10, 100 y 1 000 μ g/ mL; equivalente a 10, 100, y 1 000 ppm, en cada vial (diagrama 6).

Se realizaron observaciones a las 24 horas para contar sobrevivientes. Las pruebas se realizaron por quintuplicado, se corrió un testigo positivo el cual solamente tenía agua salina y las larvas de crustáceo y, otro negativo que contenía dicromato de potasio en las mismas concentraciones que los extractos.

Los resultados se evaluaron de acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 5. Clasificación de CL₅₀ (McLaughlin *et al.*, 1998).

Concentración	Clasificación
CL ₅₀ < 200 μ g/mL	Muy tóxicos
CL ₅₀ > 500 μ g/mL	Moderadamente tóxicos
CL ₅₀ > 1 000 μ g/mL	No tóxicos

En caso de que existieran muertes en el testigo, los valores de las concentraciones se corregirían mediante la fórmula de Abbot's.

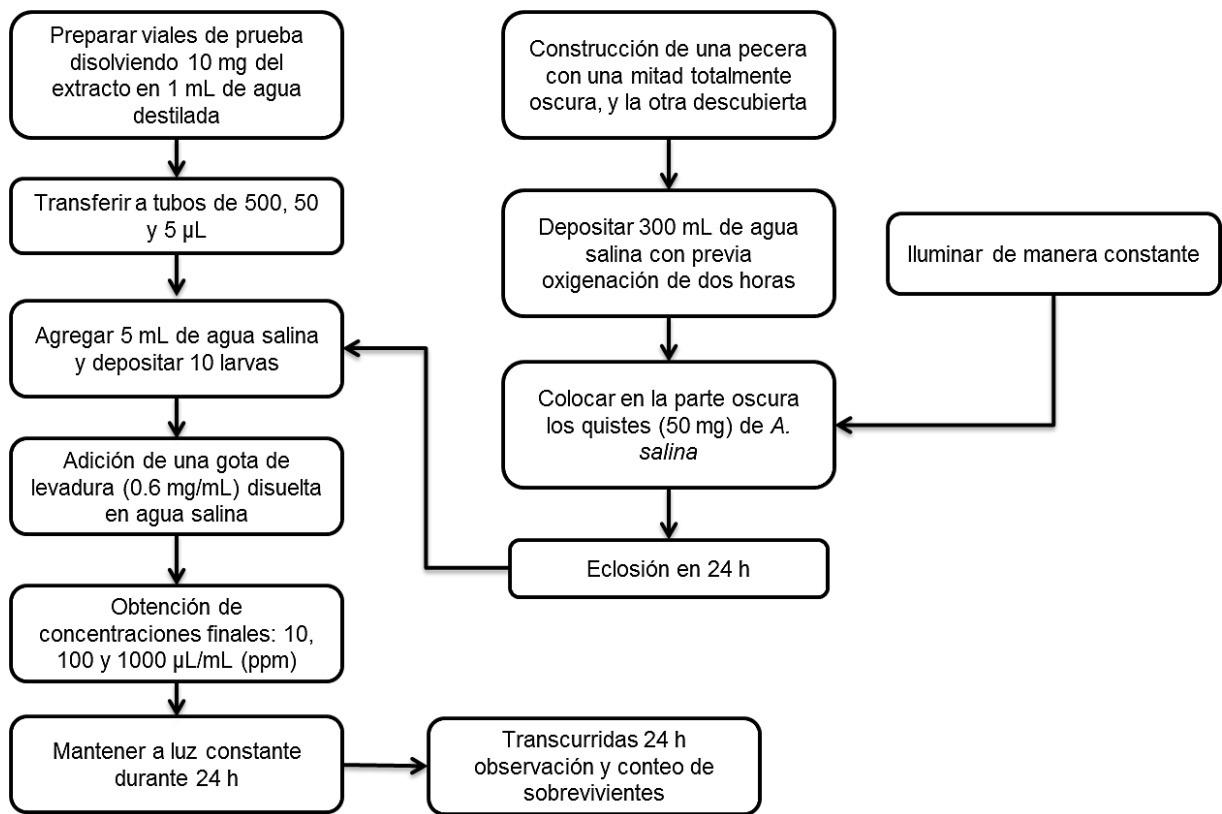


Diagrama 7. Prueba de actividad biológica sobre *A. salina*.

6.6. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se analizaron utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion (versión de prueba). Para determinar el efecto de cada extracto sobre cada una de las bacterias se realizó un Análisis de Varianza Simple (ANOVA) con un 95% de confianza. Para determinar el extracto más activo sobre el conjunto de las bacterias ensayadas, se empleó el Análisis de Varianza Multifactorial (MANOVA) con un 95% de confianza para separar e identificar las medias diferentes, en cada análisis se utilizó la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) con un 95% de confianza.

Para analizar el efecto de las diversas dosis de los extractos, los valores de las concentraciones letal media (CL₅₀) y letal (CL₁₀₀) se calcularon empleando el método Probit.

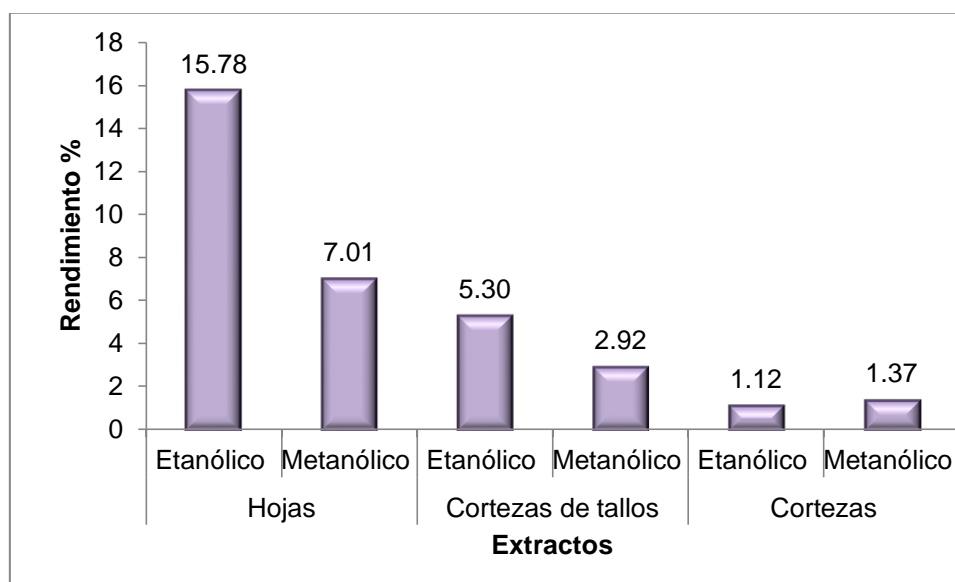
VII. RESULTADOS

7.1. Registro del material vegetal

La identificación taxonómica de *T. stans* fue corroborada por el personal del Herbario Eizi Matuda de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Un ejemplar herborizado se encuentra depositado en la colección botánica del mismo con el número de registro 45674.

7.2. Rendimiento de los extractos

De las hojas, cortezas de tallos y cortezas secas de *T. stans* se obtuvieron extractos con dos disolventes distintos: etanol y metanol (gráfica 1).



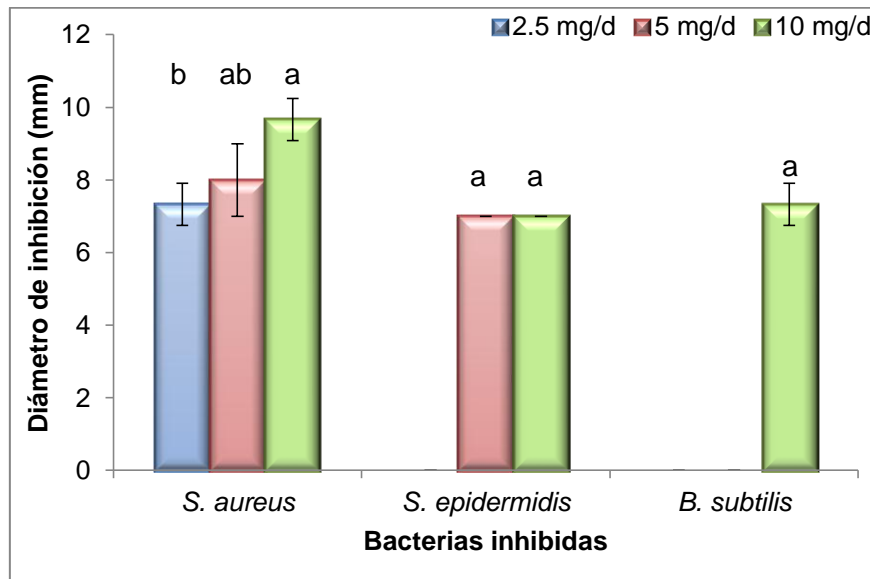
Gráfica 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de *T. stans*.

Los extractos de las hojas fueron los de mayor rendimiento, el etanólico con 15.78% seguido del metanólico con 7.01%; los de cortezas de tallos con menor rendimiento (5.30%) con etanol y con metanol menos (2.92%). Mientras que las cortezas fueron las de escaso rendimiento ya que el etanólico y el metanólico fueron de 1.12 y 1.37% respectivamente. Las hojas por lo tanto son las que contienen una mayor cantidad de sólidos.

Efecto de los extractos de hojas

El extracto etanólico de hojas fue activo frente a tres de las trece bacterias ensayadas: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*, todas Grampositivas, mostrando actividad con las tres concentraciones para la primera cepa, mientras que en la segunda se obtuvo inhibición con 5 y 10 mg/d, y la última fue susceptible únicamente a la mayor concentración evaluada. Los diámetros de inhibición de la menor a la mayor concentración para *S. aureus* fueron en promedio de 7.33, 8 y 9.67 mm respectivamente, mientras que para *S. epidermidis* fue de 7 mm en ambos casos y para *B. subtilis* de 7.33 mm (figura 19).

En ninguno de los casos hubo dosis-dependencia y la actividad únicamente fue estadísticamente significativa para *S. aureus* y *B. subtilis* ($P=0.0001$) (gráfica 2, anexos 2 y 5).



Gráfica 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Las líneas indican la desviación estándar y las letras diferentes señalan la diferencia significativa entre las concentraciones.

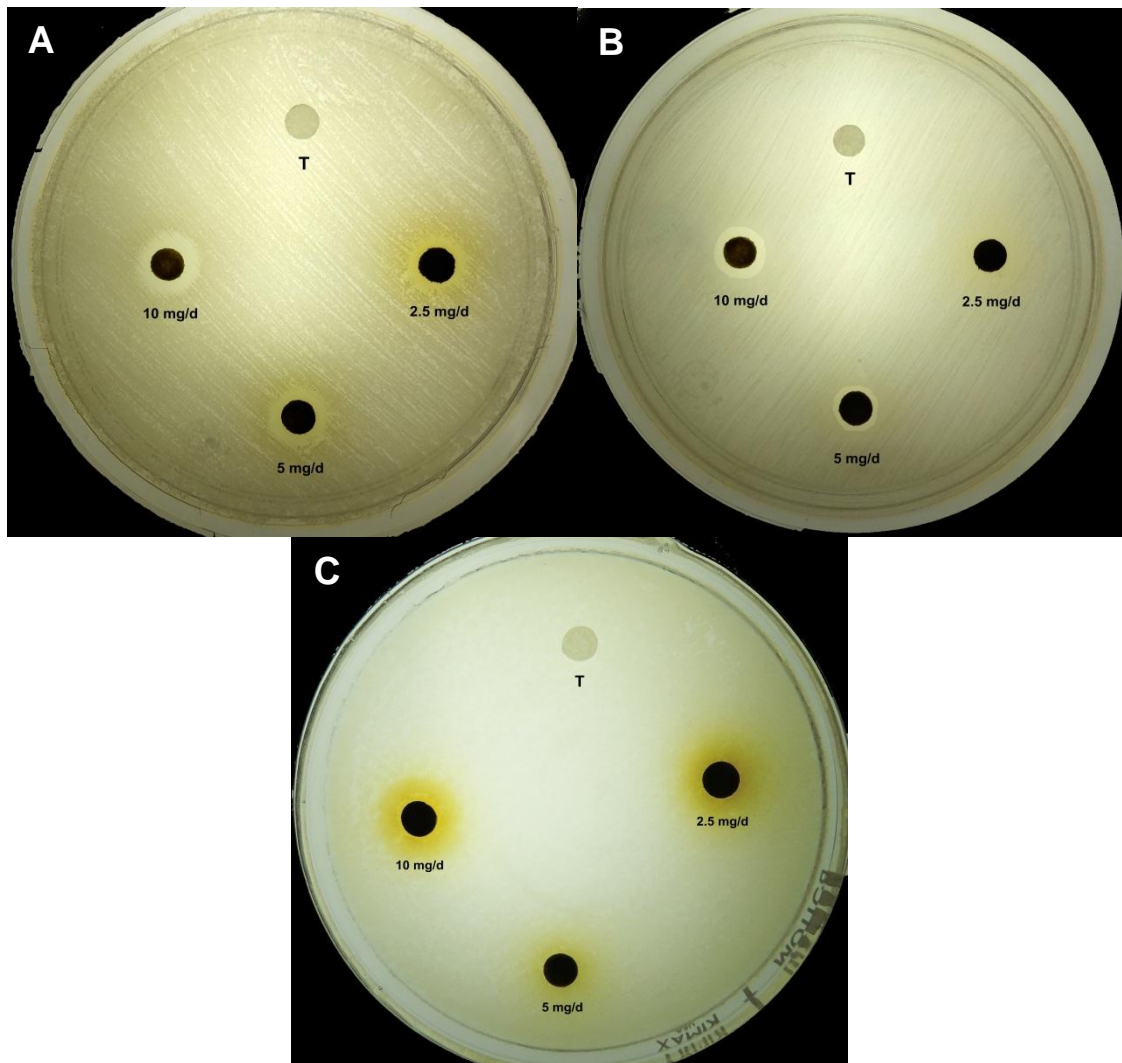
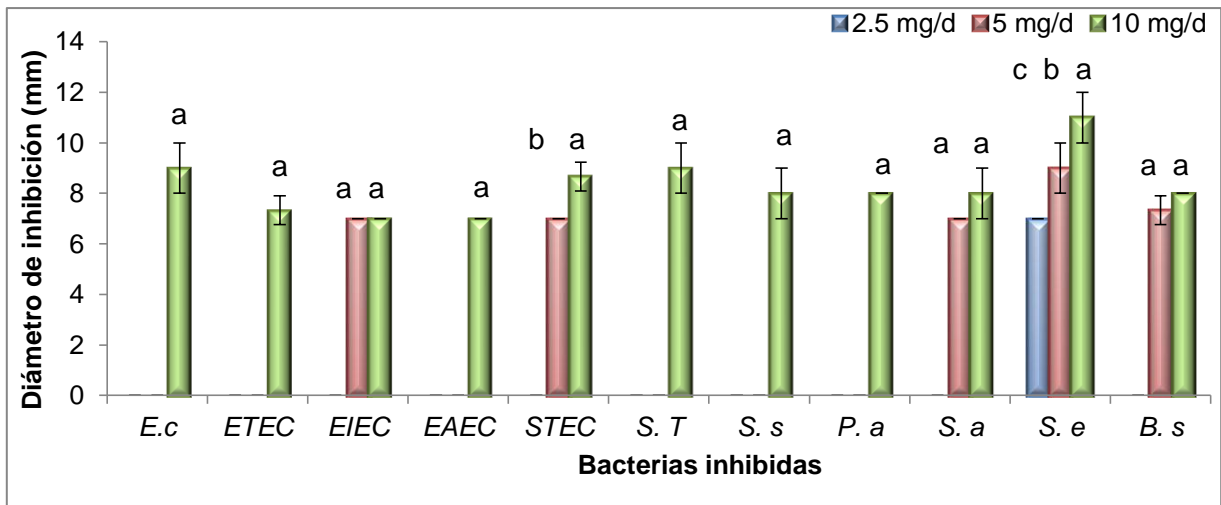


Figura 19. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico de hojas de candox. A: *S. aureus*; B: *S. epidermidis*; C: *B. subtilis*.

El extracto metanólico de esta misma estructura fue el más activo, puesto que inhibió a once de las trece bacterias, sin embargo la mayoría solo con la más alta concentración (10 mg/d), con excepción de EIEC, STEC, *S. aureus* y *B. subtilis* que también presentaron inhibición en la concentración de 5 mg/d, cabe resaltar que *S. epidermidis* fue la única bacteria inhibida en las tres concentraciones, cuyos halos fueron de 7 a 11 mm, mostrando también la concentración del extracto dosis-dependencia (gráfica 3, figuras 20 y 21, anexos 2 y 5).



Gráfica 3. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Las líneas indican la desviación estándar y las letras diferentes señalan la diferencia significativa entre las concentraciones. Las abreviaturas corresponden a: *E. c*: *E. coli*; *ETEC*: *E. coli* enterotoxigénica; *EIEC*: *E. coli* enteroinvasiva; *EAEC*: *E. coli* enteroagregativa; *STEC*: *E. coli* productora de toxina Shiga; *S. T*: *S. Typhi*; *S. s*: *S. sonnei*; *P. a*: *P. aeruginosa*; *S. a*: *S. aureus*; *S. e*: *S. epidermidis*; *B. s*: *B. subtilis*.

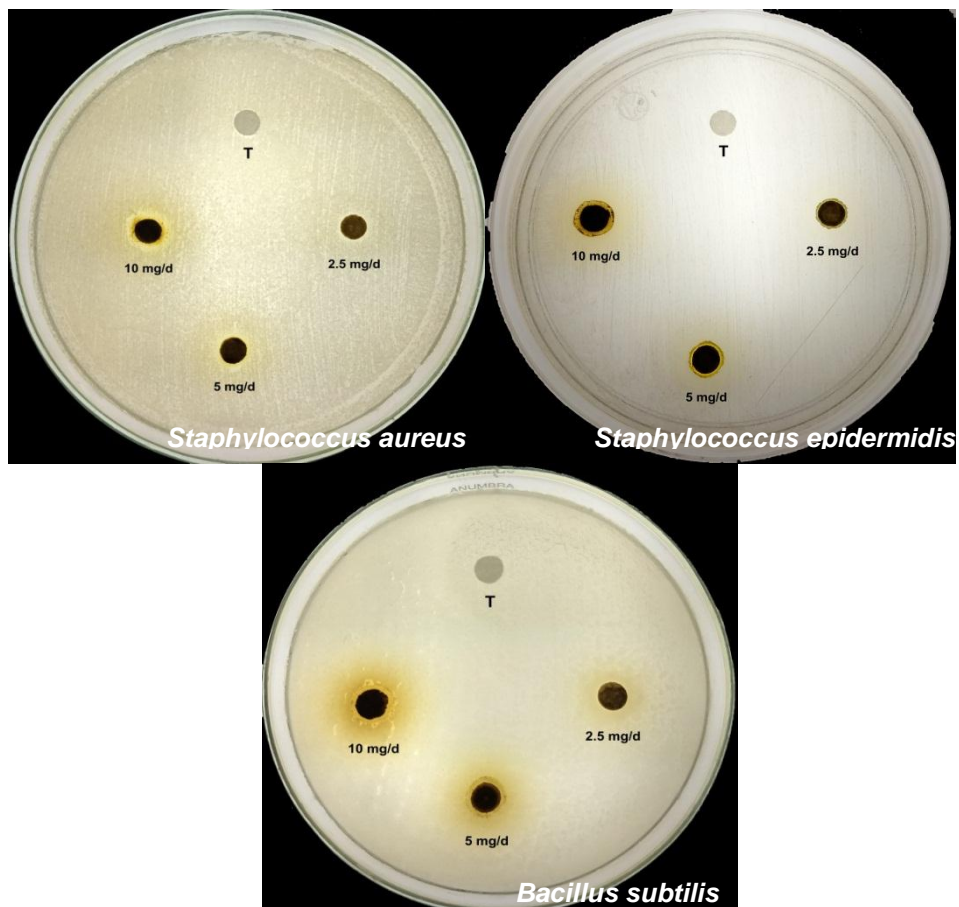


Figura 20. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de hojas sobre Grampositivas.

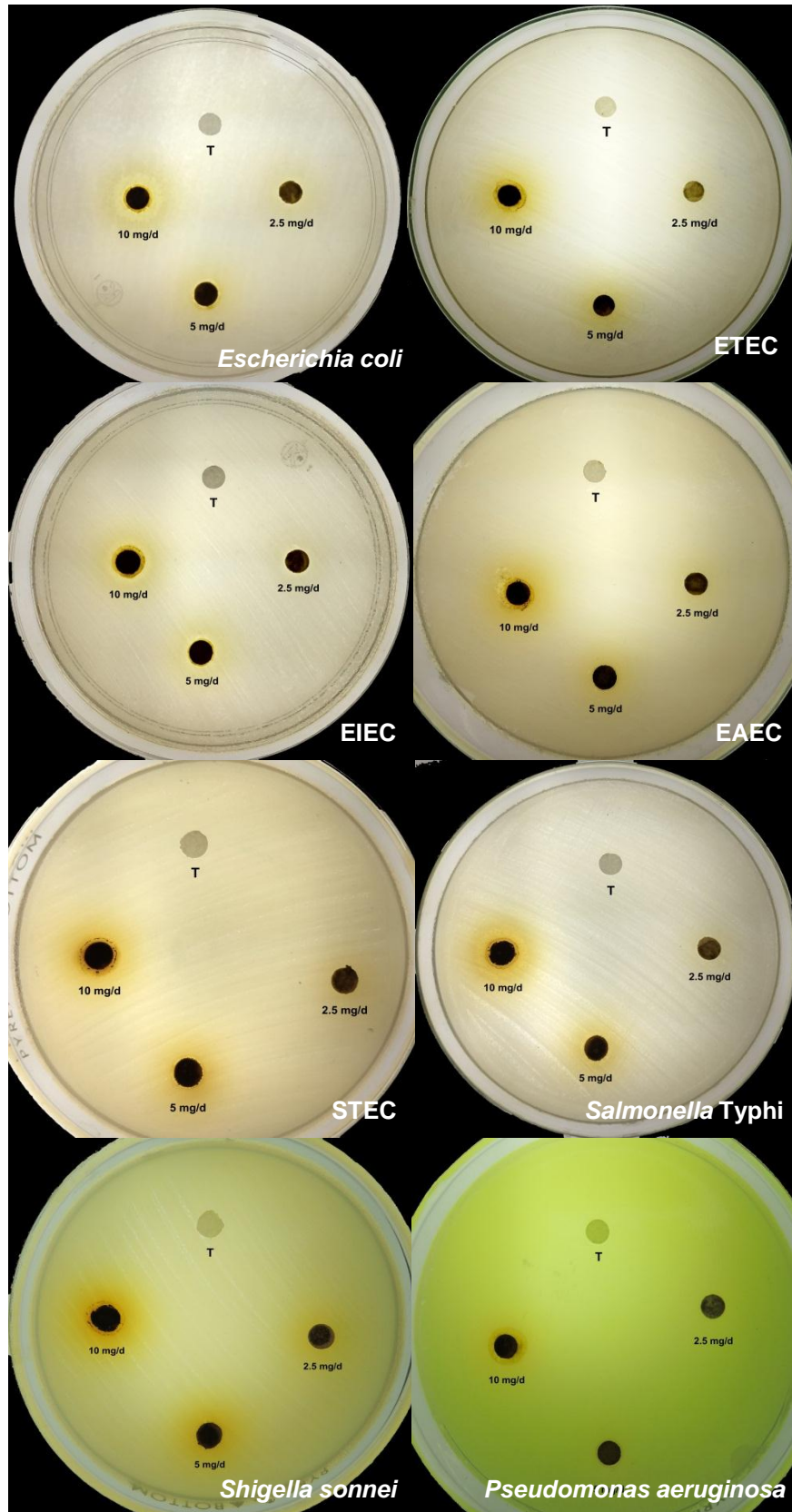


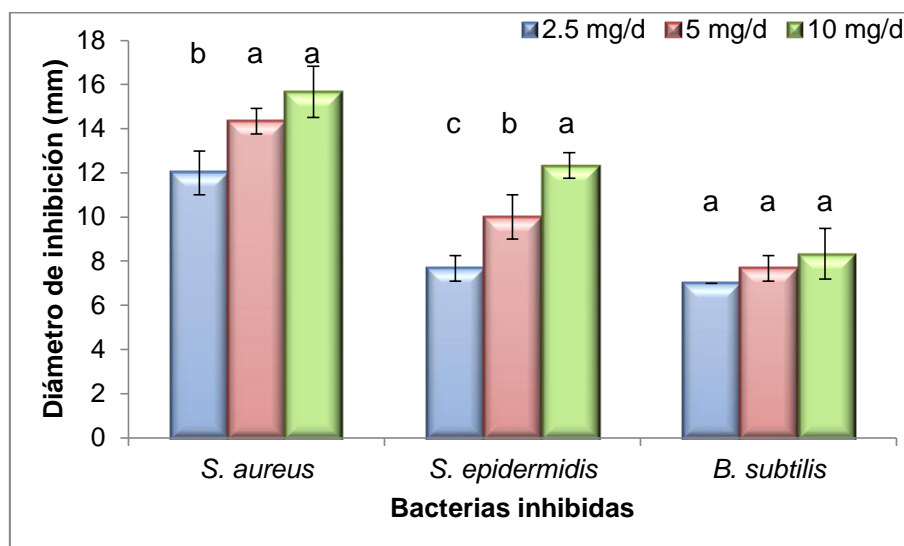
Figura 21. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de hojas sobre Gramnegativas.

Cabe resaltar que los resultados fueron estadísticamente significativos frente a *E. coli*, ETEC, STEC, *S. Typhi*, *S. sonnei*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis* ($P=0.0001$) (anexo 5).

Efecto de los extractos de cortezas de tallos

El extracto etanólico de cortezas de tallos fue activo frente a *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*, todas estas con las tres concentraciones. Los diámetros de inhibición fueron más grandes sobre *S. aureus*: 12, 14.33 y 15.67 mm para las concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/d respectivamente, el efecto del extracto fue significativo ($P=0.0001$) (anexo 6).

Con *S. epidermidis* las zonas de inhibición correspondieron a 7.67, 10 y 12.33 mm de acuerdo a cada concentración creciente, además hubo dosis-dependencia respecto a la concentración del extracto de cortezas de tallos (figura 22, anexos 3 y 6). En el caso de *B. subtilis* la inhibición fue menor con zonas de 7, 7.67 y 8.33 mm respectivamente. Las tres cepas presentaron susceptibilidad significativa ($P=0.0001$) al extracto etanólico (gráfica 4, figura 22, anexo 6).



Gráfica 4. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de cortezas de tallos. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Las líneas indican la desviación estándar y las letras diferentes señalan la diferencia significativa entre las concentraciones.

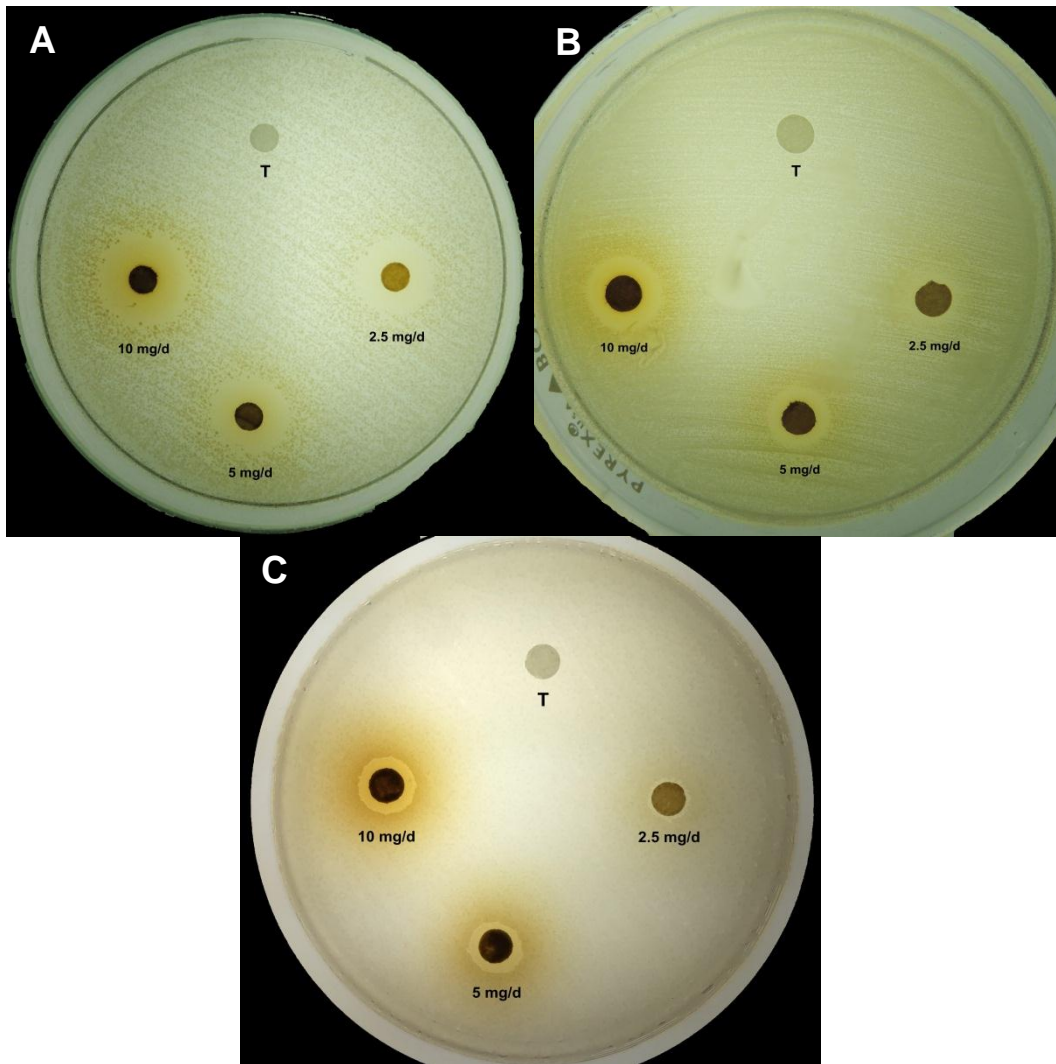
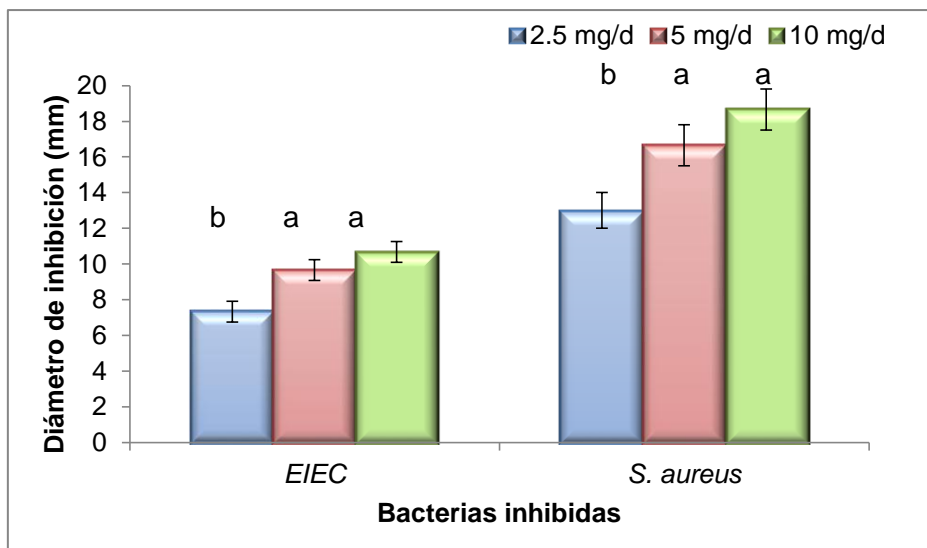


Figura 22. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico de cortezas de tallos de candox. A: *S. aureus*; B: *S. epidermidis*; C: *B. subtilis*.

El extracto metanólico fue activo solo frente a las cepas EIEC y *S. aureus*, en las tres concentraciones, los diámetros de los halos de la primera cepa fueron de 7.33, 9.66 y 10.67 mm y 13, 16.66 y 18.67 mm para la segunda, éstas dos bacterias fueron las que produjeron las zonas de inhibición más grandes del experimento. Cabe señalar que el extracto en ambas bacterias tuvo actividad significativa ($P=0.0001$) (gráfica 5, figura 23, anexos 3 y 6).



Gráfica 5. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de cortezas de tallos. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Las líneas indican la desviación estándar y las letras diferentes señalan la diferencia significativa entre las concentraciones. EIEC: *E. coli* enteroinvasiva.

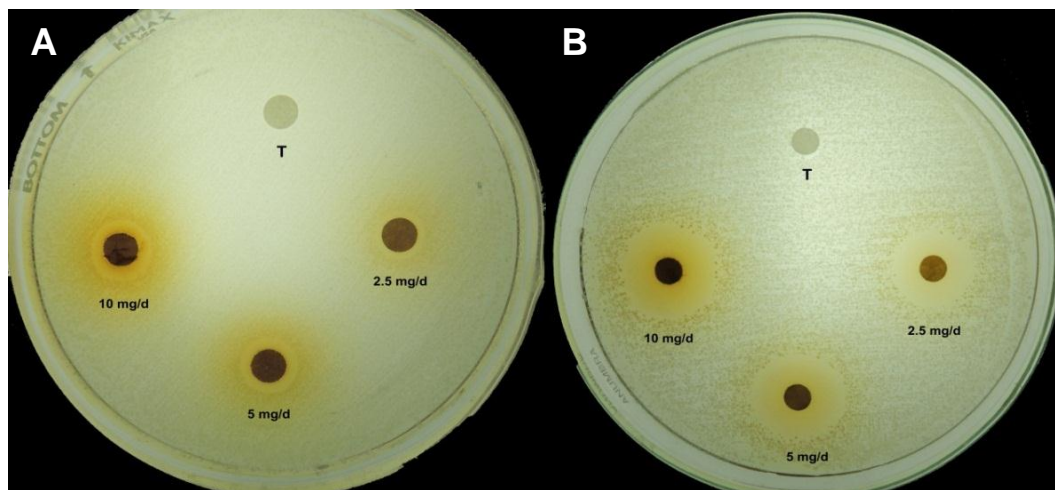
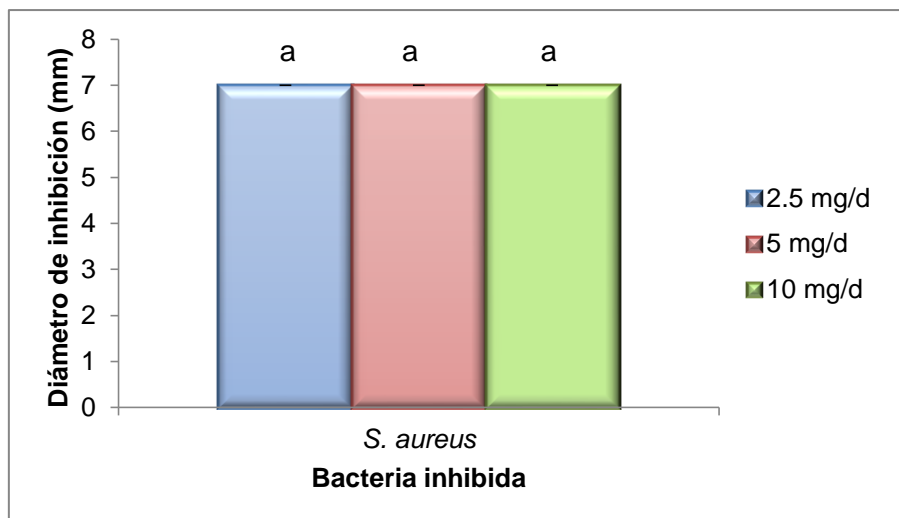


Figura 23. Zonas de inhibición producidas por el extracto metanólico de cortezas de tallos de candox. A: EIEC; B: *S. aureus*.

Efecto de los extractos de cortezas

El extracto etanólico únicamente inhibió a *S. aureus* en las tres concentraciones, donde el promedio de la zona de inhibición para cada uno fue de 7 mm (figura 24, gráfica 6, anexos 4 y 7).



Gráfica 6. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de cortezas. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Las líneas indican la desviación estándar y las letras diferentes señalan la diferencia significativa entre las concentraciones.

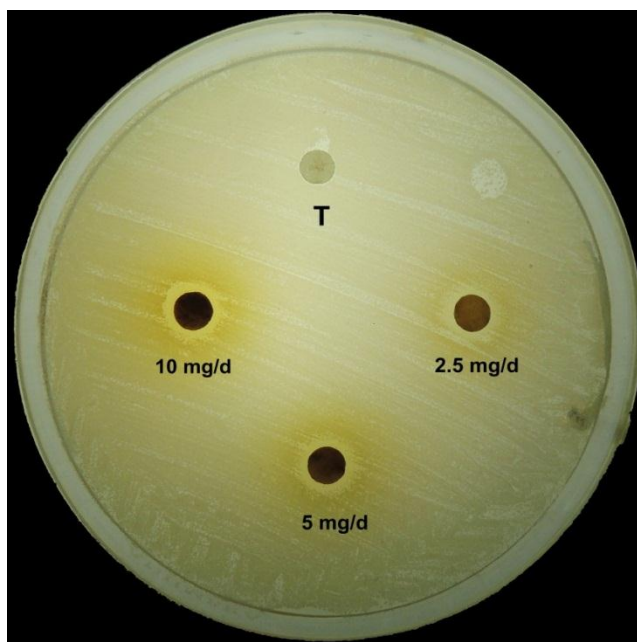
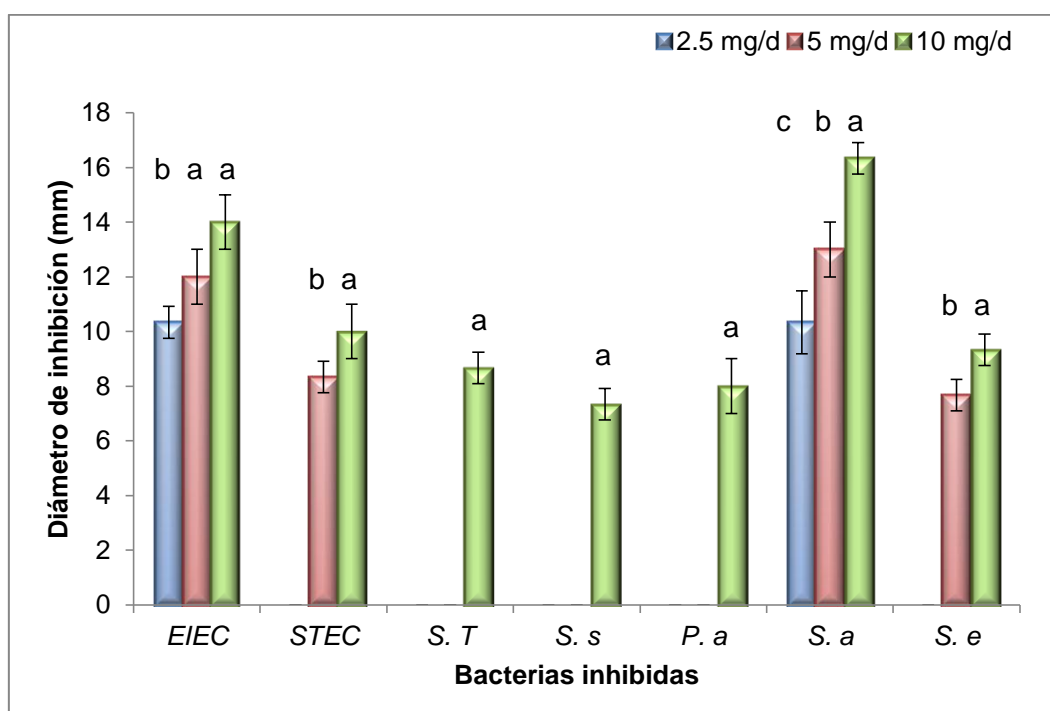


Figura 24. Halos de inhibición producidos por el extracto etanólico de cortezas sobre *S. aureus*.

El extracto metanólico de cortezas fue el segundo más activo puesto que inhibió a siete de las trece cepas (figura 25), produciendo mayor inhibición con las tres concentraciones evaluadas sobre *S. aureus* en la que se obtuvieron las mayores zonas de inhibición, las cuales fueron de 10.33, 13 y 16.33 mm para las

concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/d, además se observó dosis-dependencia; y en EIEC las zonas sin crecimiento con diámetros de 10.33, 12 y 14 mm respectivamente; mientras que STEC y *S. epidermidis* presentaron halos de inhibición en las concentraciones de 5 y 10 mg/d (gráfica 7, anexos 4 y 7).

Frente a *S. Typhi*, *S. sonnei* y *P. aeruginosa* solo se obtuvieron zonas sin crecimiento con la mayor concentración (10 mg/d). Todas las bacterias señaladas en este apartado tuvieron sensibilidad significativa estadísticamente ($P=0.0001$) al extracto ensayado (gráfica 7, anexos 4 y 7).



Gráfica 7. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de cortezas. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Las líneas indican la desviación estándar y las letras diferentes señalan la diferencia significativa entre las concentraciones. Las abreviaturas corresponden a: EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga; S. T: *S. Typhi*; S. s: *S. sonnei*; P. a: *P. aeruginosa*; S. a: *S. aureus*; S. e: *S. epidermidis*.

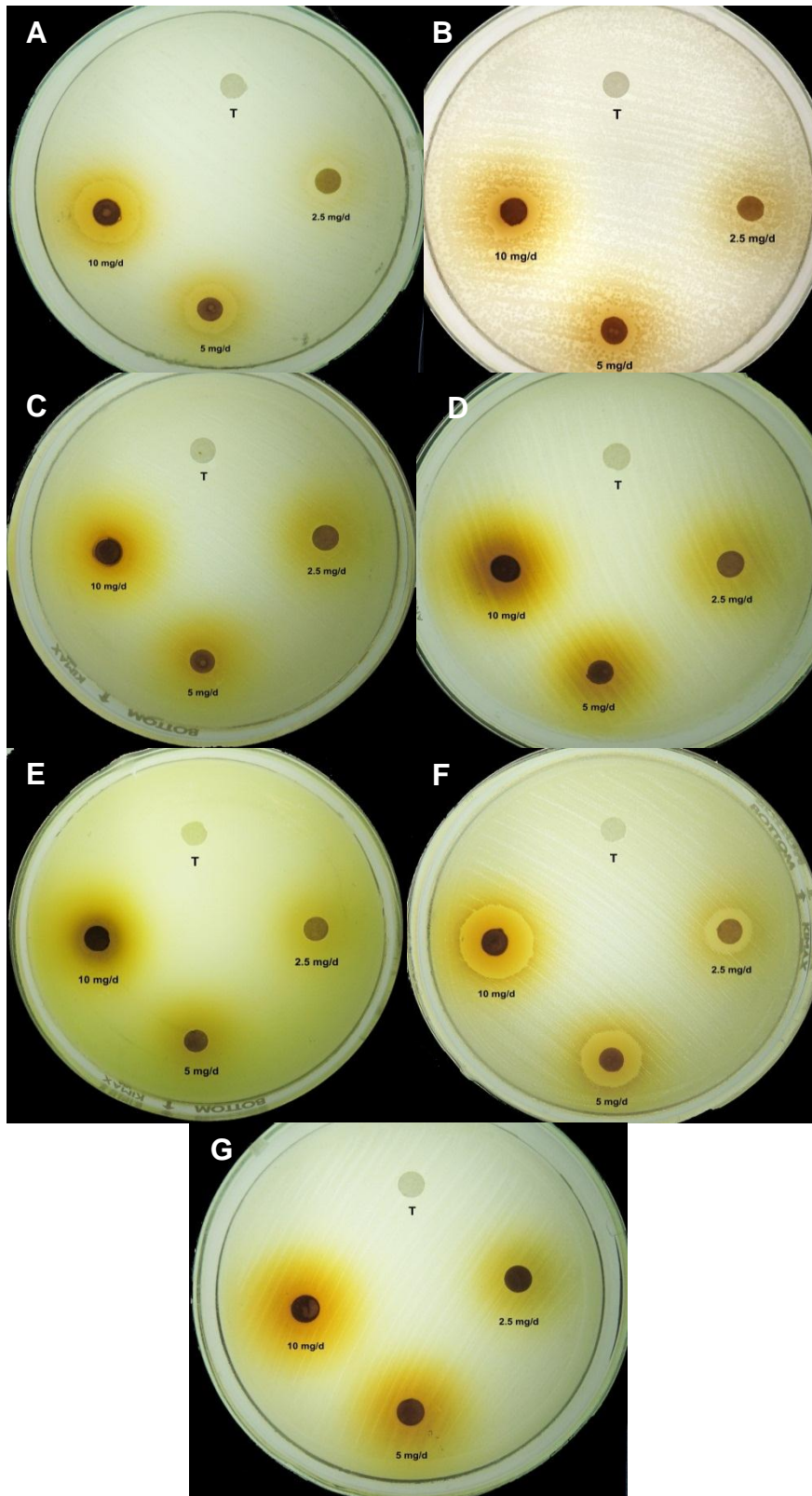


Figura 25. Zonas de inhibición producidas por el extracto metanólico de cortezas. A: EIEC; B: STEC; C: *S. Typhi*; D: *S. sonnei*; E: *P. aeruginosa*; F: *S. aureus*; G: *S. epidermidis*.

Al comparar la actividad antibacteriana de los órganos de la planta evaluada, se observó que las hojas exhibieron mayor efecto al impedir el crecimiento de once de las trece bacterias ensayadas, seguido de las cortezas que fueron activas contra siete bacterias y los de cortezas de tallos con cuatro. Asimismo se observó que *S. aureus*, *S. epidermidis* y EIEC fueron sensibles a los tres órganos, mientras que *E. coli*, ETEC y EAEC solo fueron inhibidas por las hojas (cuadro 6, anexo 8).

Cuadro 6. Efecto de las estructuras de *T. stans* sobre las bacterias ensayadas.

Gram	Bacterias	Estructuras		
		Hojas	Cortezas de tallos	Cortezas
Negativas	<i>E. coli</i>	*		
	EPEC			
	ETEC	*		
	EIEC	*	*	*
	EAEC	*		
	STEC	*		*
	<i>S. Typhi</i>	*		*
	<i>S. sonnei</i>	*		*
	<i>P. aeruginosa</i>	*		*
Positivas	<i>S. aureus</i>	*	*	*
	<i>S. epidermidis</i>	*	*	*
	<i>B. subtilis</i>	*	*	
	<i>S. pyogenes</i>			

* Inhibición

El extracto más activo fue el metanólico de hojas, ya que inhibió al mayor número de bacterias (8 Gramnegativas y 3 Grampositivas), seguido del metanólico de cortezas que corresponde a siete cepas (5 Gramnegativas y 2 Grampositivas), el menos activo fue el etanólico de cortezas (una Grampositiva) (anexo 8).

En todos los casos la concentración de 10 mg/d fue la que produjo mayores halos de inhibición. *S. aureus* fue la bacteria con los halos inhibitorios más grandes - el mayor de 18.66 mm de diámetro- provocado por el extracto metanólico de cortezas

de tallos. Esta bacteria también resultó ser la más sensible a todos los extractos, ya que fue inactivada por los seis extractos con al menos una de las concentraciones utilizadas (anexos 2, 3 y 4).

7.3. Concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de los extractos más activos

El valor de la CIM se consideró como la mínima concentración de extracto necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático) y la CBM es la mínima concentración que destruye totalmente a la bacteria (efecto bactericida).

El criterio de elegibilidad consistió en seleccionar los extractos que produjeron zonas de inhibición igual o mayores a 10 mm de diámetro en las tres concentraciones evaluadas, por lo que los extractos etanólico y metanólico de cortezas de tallos fueron valorados frente a *S. aureus*, mientras que el extracto metanólico de cortezas sobre *S. aureus* y EIEC.

El extracto metanólico de cortezas de tallos frente a *S. aureus* presentó una CIM de 0.3125 mg/mL, teniendo una CBM con el mismo valor por lo que se denota un efecto bactericida, mientras que el extracto etanólico de cortezas de tallos frente a esta misma bacteria tuvo también un efecto bactericida, ya que los valores de la CIM y CBM corresponden a 0.625 mg/mL (cuadro 7, figura 26, anexo 9).

Cuadro 7. Efecto CIM y CBM de los extractos de cortezas de tallos y cortezas.

Extracto	Bacteria	CIM*	No. de colonias	CBM*
Cortezas de tallos etanólico	<i>S. aureus</i>	0.625	0	0.625
Cortezas de tallos metanólico		0.3125	0	0.3125
Cortezas metanólico	EIEC	0.625	0	0.625
	<i>S. aureus</i>	0.3125	4	0.625

*:Expresada en mg/mL

El extracto metanólico de cortezas en concentración de 0.625 mg/mL produjo sobre la cepa EIEC efecto bactericida (cuadro 7, figura 27, anexo 9), mientras que el

mismo extracto presentó una CIM con valor de 0.3125 mg/mL y una CBM de 0.625 mg/mL frente a *S. aureus* (efecto bacteriostático) (cuadro 7, figura 28, anexo 9).

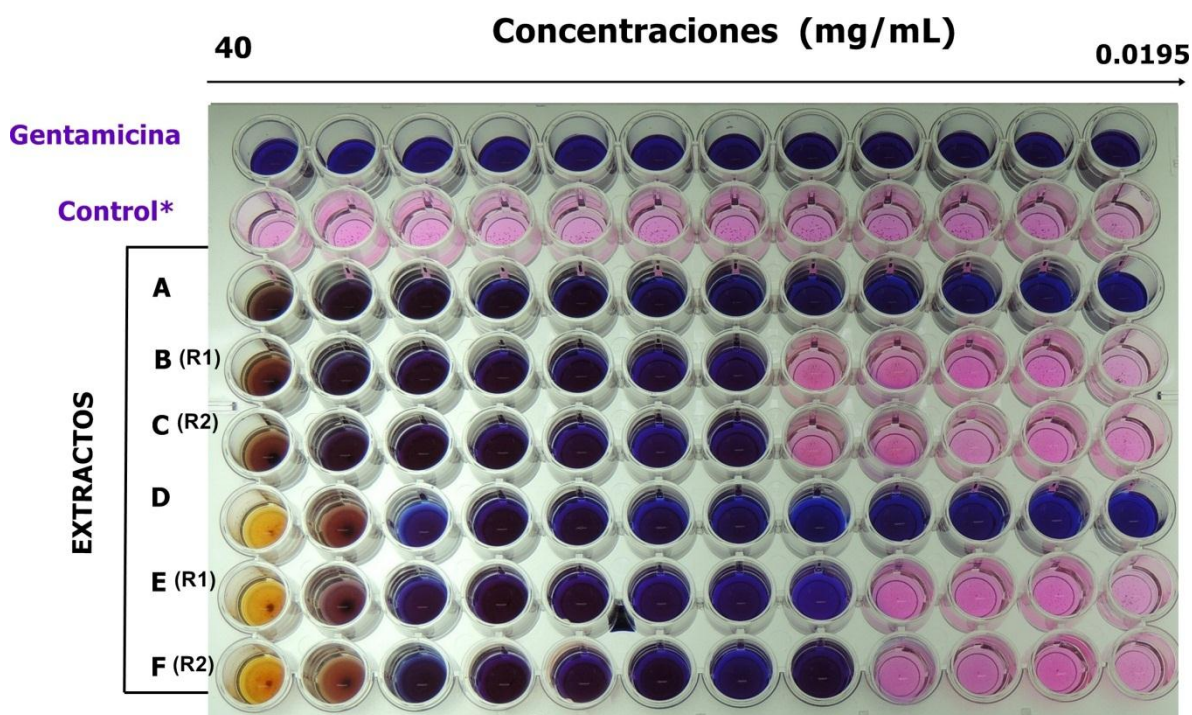


Figura 26. CIM de los extractos de *T. stans* sobre *S. aureus*. Control*: Caldo, bacteria e indicador; A: Control de esterilidad de etanólico de cortezas de tallos; B: Etanólico de cortezas de tallos con bacteria (repetición 1); C: Etanólico de cortezas de tallos con bacteria (repetición 2); D: Control de esterilidad de metanólico de cortezas de tallos; E: Metanólico de cortezas de tallos con bacteria (repetición 1); F: Metanólico de cortezas de tallos con bacteria (repetición 2).

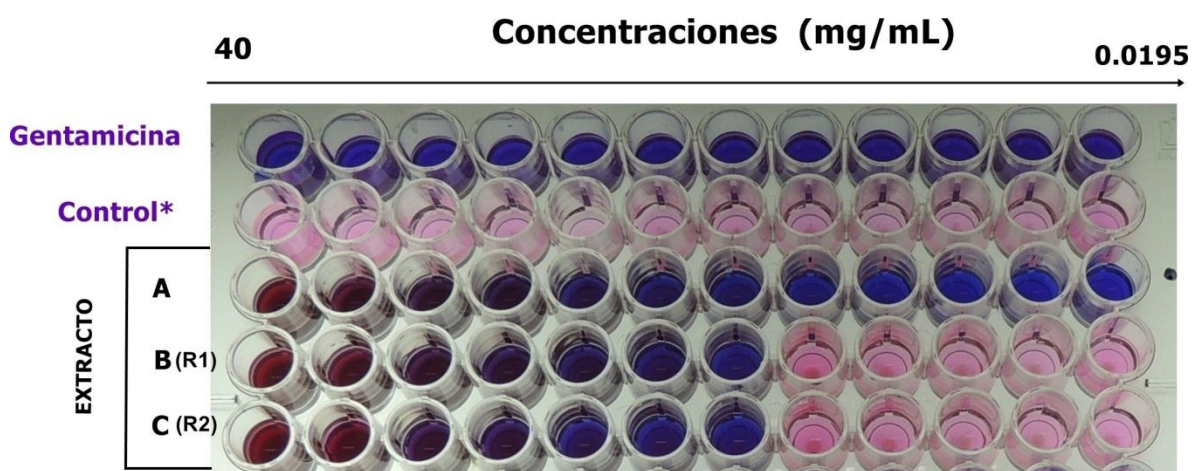


Figura 27. CIM del extracto metanólico de cortezas sobre EIEC. Control*: Caldo, bacteria e indicador; A: Control de esterilidad de metanólico de cortezas; B: Metanólico de cortezas con bacteria (repetición 1); C: Metanólico de cortezas con bacteria (repetición 2).

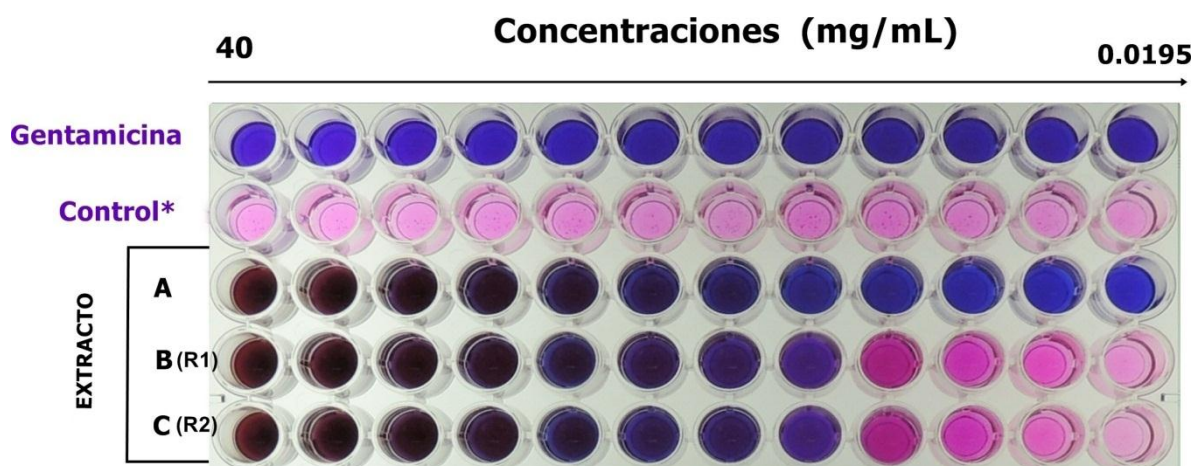


Figura 28. CIM del extracto metanólico de cortezas sobre *S. aureus*. Control*: Caldo, bacteria e indicador; A: Control de esterilidad de metanólico de cortezas; B: Metanólico de cortezas con bacteria (repetición 1); C: Metanólico de cortezas con bacteria (repetición 2).

7.4. Grupos de metabolitos secundarios

Se identificaron los grupos de MS presentes en diversos extractos de *T. stans*, mediante ocho pruebas de coloración y precipitación. Se observaron cinco grupos: fenoles, taninos condensados, glucósidos, saponinas y lactonas sesquiterpénicas, los cuales variaron de una estructura botánica a otra, así como en la intensidad de reacción con respecto al disolvente utilizado. Cabe mencionar que solo los fenoles en diferente intensidad de reacción estuvieron presentes en todos los extractos (cuadro 8).

Cuadro 8. Grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos de candox.

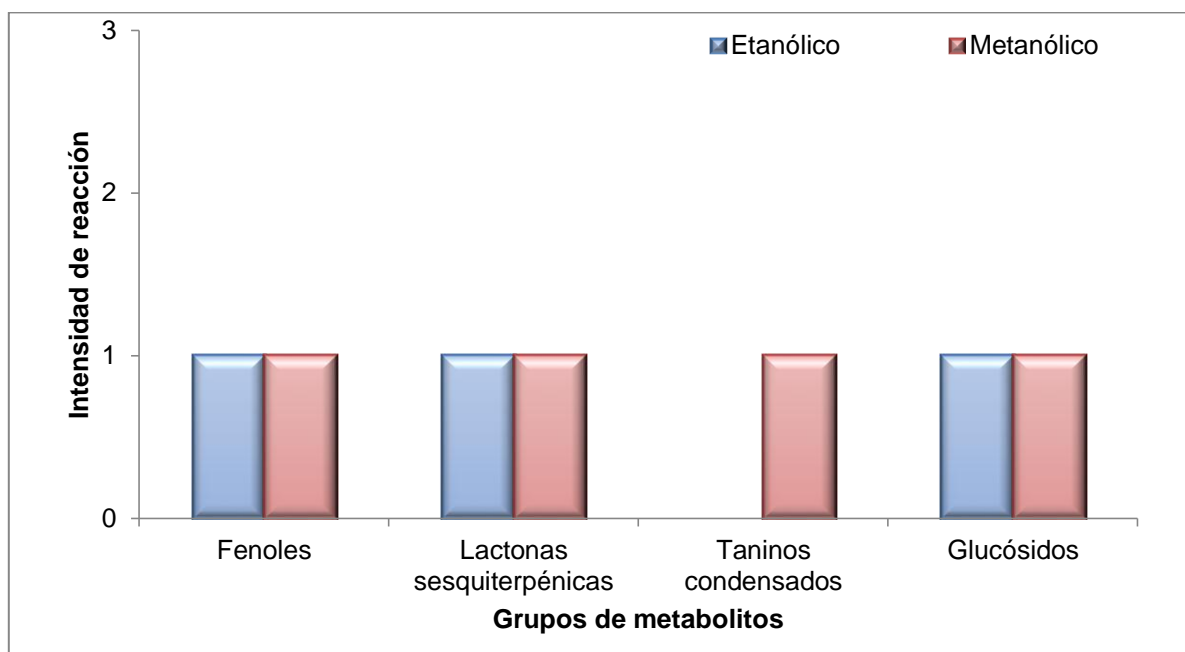
Grupos		Hojas		Cortezas de tallos		Cortezas	
		Etanol	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol
Fenoles		+	+	+++	++	+++	+++
Alcaloides		-	-	-	-	-	-
Flavonoides	Flavona	-	-	-	-	-	-
	Flavonona	-	-	-	-	-	-
	Flavonol	-	-	-	-	-	-
	Xantinas	-	-	-	-	-	-
Glucósidos		+	+	+	+	-	+

Saponinas		-	-	-	-	+	-
Lactonas sesquiterpénicas		+	+	-	-	-	-
Taninos	Condensados	-	+	++	+	+	+++
	Hidrolizados	-	-	-	-	-	-
Terpenos		-	-	-	-	-	-
Esteroides		-	-	-	-	-	-

Intensidad de reacción: -: nula; +: baja; ++: media; +++: alta.

Grupos de metabolitos secundarios en los extractos de hojas.

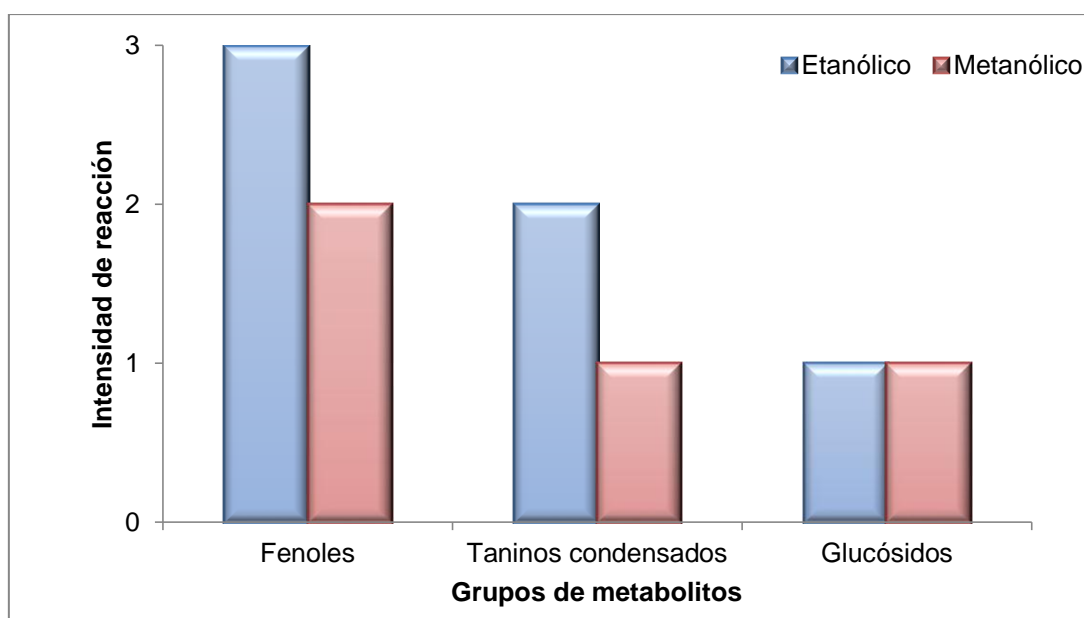
Los extractos de hojas presentaron cuatro grupos de MS: fenoles, lactonas sesquiterpénicas, taninos condensados y glucósidos, todos en baja intensidad de reacción, el extracto metanólico presentó dichos grupos y el etanólico difirió en la ausencia de los taninos (gráfica 8, anexos del 10 al 17).



Gráfica 8. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en los extractos de hojas.

Grupos de metabolitos secundarios en los extractos de cortezas de tallos.

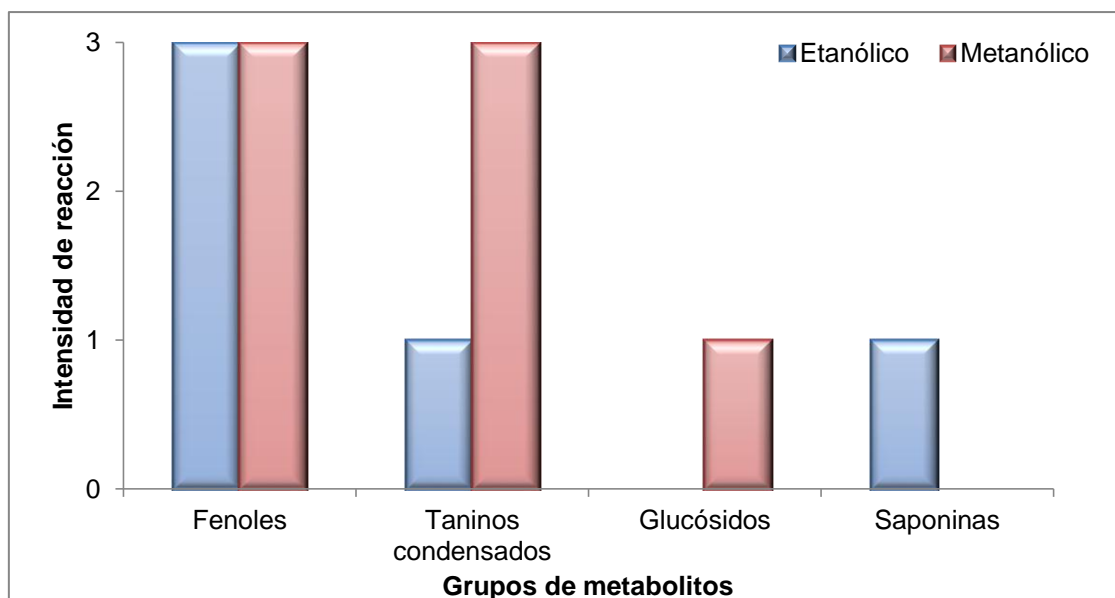
Tanto el extracto etanólico como metanólico de cortezas de tallos presentaron fenoles, taninos condensados y glucósidos, sin embargo los fenoles en el extracto etanólico presentaron una intensidad de reacción mayor que en el de metanol (media intensidad) mientras que los taninos condensados en el extracto metanólico se observaron con intensidad baja y media en el etanólico. Para el caso de los glucósidos en ambos extractos fue baja la intensidad (gráfica 9, anexos del 10 al 17).



Gráfica 9. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en los extractos de cortezas de tallos.

Grupos de metabolitos secundarios en los extractos de cortezas.

Las cortezas presentaron fenoles, taninos condensados, saponinas y glucósidos, sin embargo la concentración varió dependiendo del tipo de solvente (gráfica 10). Los fenoles en ambos extractos se observaron con la mayor intensidad de reacción. Se presentó mayor concentración de taninos condensados en el extracto metanólico. Los glucósidos fueron presentes únicamente en el extracto etanólico a baja concentración; mientras que las saponinas fueron determinadas en intensidad baja para el extracto etanólico y ausentes para el metanólico (gráfica 10, anexos del 10 al 17).



Gráfica 10. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en los extractos de cortezas.

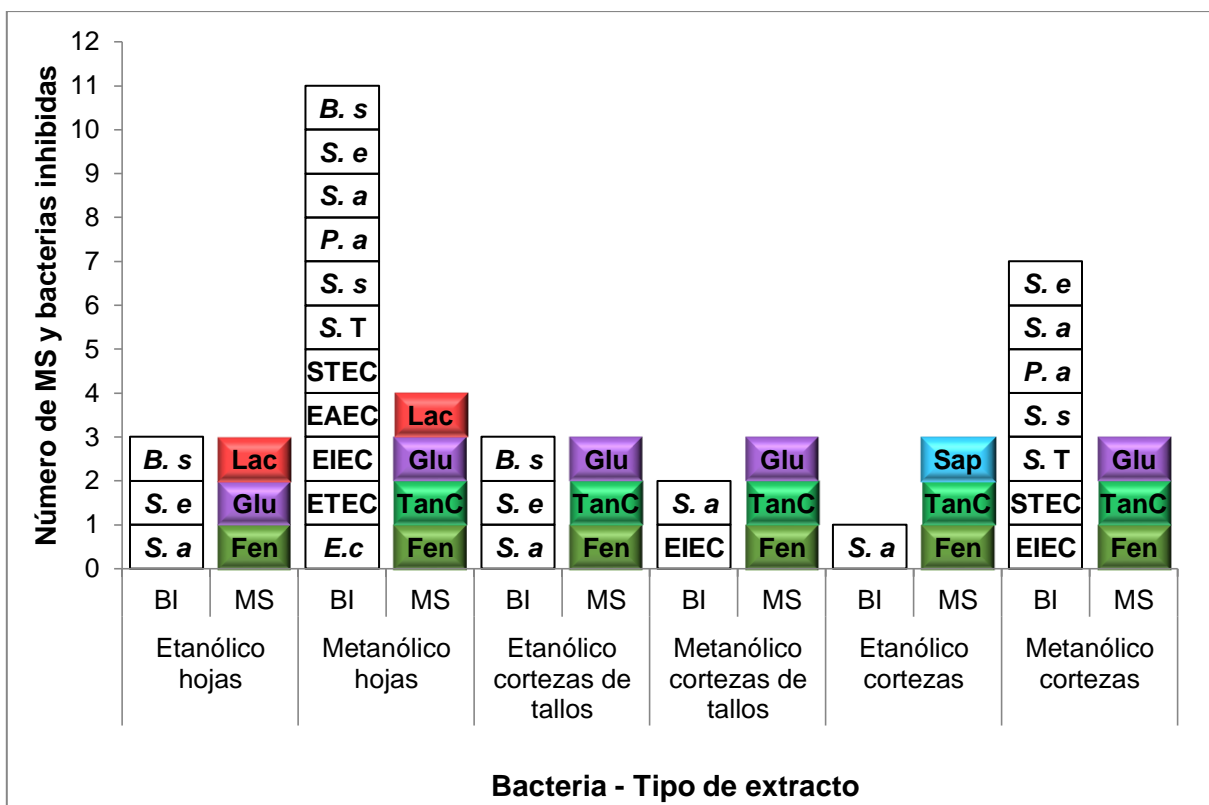
Metabolitos secundarios vs bacterias inhibidas

En este apartado se compara la presencia de los grupos de metabolitos secundarios identificados en los diferentes extractos con las bacterias inhibidas.

Se identificaron fenoles en todos los extractos evaluados. En el extracto etanólico al igual que el metanólico de hojas se encontraron tres grupos en común: fenoles, glucósidos y lactonas, también se inhibieron tres bacterias en común: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*; el extracto metanólico además de estos tres grupos presentó taninos de tipo condensados, pero a diferencia del etanólico, éste inhibió a once bacterias, el hecho de que inhibiera un mayor número de bacterias se debe posiblemente a la actividad antibacteriana que se reporta en los taninos condensados de acuerdo a Castillo y Martínez (2007).

En los extractos de cortezas de tallos existe similitud de los grupos de MS encontrados (fenoles, taninos condensados y glucósidos), sin embargo el extracto etanólico impidió solo el crecimiento bacteriano de bacterias Grampositivas, mientras que el metanólico de una Grampositiva y una Gramnegativa.

Fenoles y taninos condensados son MS determinados tanto en el extracto etanólico como en el metanólico de cortezas, pero difieren en que en el primero se encontraron saponinas mientras que en el segundo glucósidos, la diferencia más notoria es en el número de bacterias inhibidas puesto que el extracto etanólico solo inhibió el crecimiento de la cepa *S. aureus*, mientras que el metanólico de cinco cepas Gramnegativas (EIEC, STEC, *S. Typhi*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa*) y dos Grampositivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*) (gráfica 11).



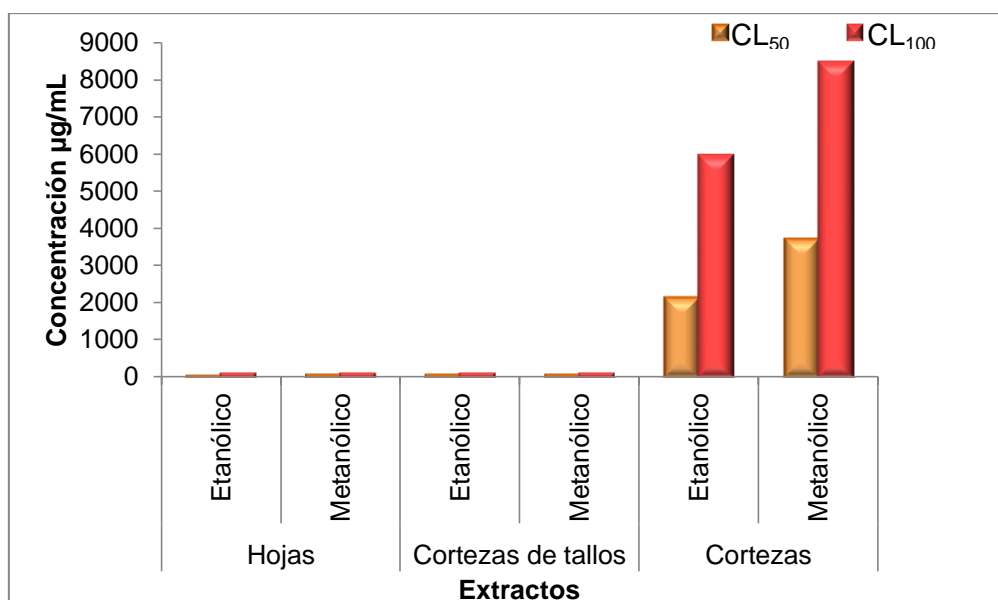
Gráfica 11. Inhibición bacteriana y MS identificados en los extractos. Las abreviaturas corresponden a: Fen: fenoles; Glu: glucósidos; Sap: saponinas; Lac: lactonas sesquiterpénicas; TanC: taninos condensados; *E. c*: *E. coli*; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EIEC: *E. coli* enteroinvasiva; EAEC: *E. coli* Enteroagregativa; STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga; *S. T*: *S. Typhi*; *S. s*: *S. sonnei*; *P. a*: *P. aeruginosa*; *S. a*: *S. aureus*; *S. e*: *S. epidermidis*; *B. s*: *B. subtilis*.

7.5. Toxicidad de los extractos

Artemia salina es útil para predecir actividades farmacológicas, responde a un amplio rango de compuestos química y farmacológicamente diversos; es por ello que tiene importancia en el seguimiento de nuevos medicamentos de origen vegetal, por lo que

es importante determinar la concentración letal (CL), donde la CL₅₀ indica la concentración en la que se produce la muerte del 50% de la población y la CL₁₀₀ señala la concentración en la que toda la población muere.

De acuerdo a la clasificación de McLaughlin *et al.* (1998) se puede señalar que el extracto etanólico de hojas fue el más tóxico ya que la CL₅₀ y CL₁₀₀ correspondió a 30.62 y 84.86 µg/mL respectivamente. Tres extractos, metanólico de hojas, y los dos de cortezas (etanólico y metanólico) presentaron el mismo valor de la CL₅₀ y CL₁₀₀ el que correspondió a 55.16 µg/mL y 92.89 µg/mL respectivamente (gráfica 12, anexos 18 y 19).



Gráfica 12. Toxicidad de los extractos de *T. stans*.

Los extractos de cortezas fueron los no tóxicos, la CL₅₀ fue de 2 127.34 y 3 987.23 µg/mL para los extractos etanólico y metanólico, y la CL₁₀₀ correspondió a 5 982.54 y 8 492 µg/mL respectivamente (gráfica 12).

VIII. DISCUSIÓN

Investigaciones químicas y farmacológicas recientes han hecho evidente la actividad biológica de *Tecoma stans*, la cual es una planta de uso frecuente y antiguo en diversas zonas del país. La Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009a) reporta su uso para diferentes padecimientos de tipo digestivo como dolor de estómago, disentería, bilis, gastritis, mala digestión, empacho, anorexia, pirosis, atonía intestinal y problemas del hígado. En la mayoría de los tratamientos se utilizan las hojas, tallos y/o ramas, cortezas, flores o raíces, por lo general se preparan en infusión o cocimiento que se administra por vía oral. Para conocer la acción biológica de esta especie se llevaron a cabo extracciones con dos disolventes de las siguientes estructuras vegetales: hojas, cortezas de tallos y cortezas deshidratadas, recolectadas en etapa vegetativa.

El mayor rendimiento de los extractos se obtuvo de las hojas (gráfica 1), lo que señala que en esta estructura se encuentra la mayor cantidad de sólidos, aunque ello no implica mayor diversidad (gráfica 11). Se utilizó el método de maceración en frío ya que como señalan Ara-Roldán (1997), Fonnegra y Jiménez (2007), y Carrión y García (2010) evita que los compuestos se modifiquen debido a que no se utiliza calor. Considerando que los disolventes usados extraen metabolitos secundarios de media a alta polaridad, es posible que en las cortezas de tallo y tronco del arbusto exista una mayor cantidad de metabolitos secundarios de baja polaridad en la época del año y etapa fenológica en que se recolectó el material vegetal.

Aunque existen diversos reportes sobre el efecto antibacteriano y el tamizaje fitoquímico de candox sólo en el de López Gómez (2012) se indica la época del año y estado fenológico de la planta cuando se recolectó el material vegetal.

De las tres estructuras botánicas de candox, las hojas tienen amplio espectro de actividad pues inhibieron a 11 de las 13 bacterias evaluadas, seguidas por las cortezas de los arbustos que no permitieron el crecimiento de cinco Gramnegativas y dos Grampositivas, y las cortezas de los tallos sólo desplegaron efecto inhibitorio sobre una cepa Gramnegativa y tres Grampositivas (cuadro 6). El efecto sobre

ambos tipos microbianos coincide con lo que reporta Govindappa *et al.* (2011) también con extractos obtenidos con etanol y metanol, aunque solo indica que recolectó en noviembre.

El extracto de mayor efecto sobre el crecimiento de los microorganismos Gramnegativos (todas excepto EPEC) y Grampositivos (menos *S. pyogenes*), fue el de metanol de hojas. Estos resultados difieren entre ellos ya que en el caso de las Gramnegativas en seis únicamente la concentración de 10 mg/d tuvo efecto, sólo en EIEC y STEC con las dos concentraciones mayores observando el mismo fenómeno con tres Grampositivas, aunque sobre *S. epidermidis* las tres concentraciones tuvieron efecto. Cabe señalar que estas diferencias producidas por el mismo tipo de extracto pueden deberse a que cada bacteria tiene sus propios mecanismos de defensa para evitar sustancias que están dispersos en el medio en el que crece.

En el trabajo de López Gómez (2012) los resultados de las hojas tienen muchas diferencias con los anotados en las líneas anteriores, ya que en las bacterias *S. aureus* y *E. coli* las tres concentraciones no permitieron el crecimiento con zonas de 9.8, 12.3 y 14.3 mm para la primera y de 7.3, 8.3 y 12.6 mm para la segunda; mientras que en *S. Typhi*, *S. sonnei* y *P. aeruginosa* las dos mayores sí tuvieron efecto y en *S. epidermidis* sólo la mayor (8.1 mm). Dichas diferencias pueden corresponder al hecho de que aunque el solvente es el mismo, el método de extracción, la etapa fenológica y la época de recolecta no lo son, pues López Gómez (2012) recolectó en noviembre y en esta investigación se realizó en mayo.

Las gráficas 2 y 3 permiten indicar que no todas las concentraciones empleadas (2.5, 5 y 10 mg/d) tuvieron efecto sobre las tres bacterias Grampositivas, además de que solo *S. pyogenes* no fue inhibida por ninguna de las concentraciones, lo que posiblemente se deba a que esta cepa produce una cubierta sobre la pared celular que le confiere protección (Tortora *et al.*, 2007). Sólo *S. aureus* fue inhibida por las tres concentraciones probadas.

El mayor efecto sobre *S. aureus* y también sobre EIEC fueron producidos por las cortezas de tallos con metanol (gráfica 5). Por otro lado, el extracto metanólico de

cortezas fue activo frente a *S. aureus* con zonas sin crecimiento de 10.33, 13 y 16.33 mm con 2.5, 5 y 10 mg/d respectivamente, valores superiores a los informados por López Gómez (2012) para el mismo tipo de extracto y estructura: los promedios reportados fueron de 8.6, 11 y 12.6 mm para las mismas concentraciones, además la autora también señala actividad frente a *S. epidermidis* con diámetros de 9.6 y 11 mm en promedio con 5 y 10 mg/d de extracto, mientras que en el presente estudio los diámetros son ligeramente menores con las mismas concentraciones (7.66 mm y 9.33 mm respectivamente).

Además, el extracto metanólico de cortezas obtenido en este estudio fue activo frente a *P. aeruginosa*, *S. sonnei* y *S. Typhi* con zonas promedio de 8, 7.33 y 8.66 mm respectivamente a la más alta concentración, mientras que las pruebas realizadas por López Gómez (2012), fueron negativas.

Son resultados de suma importancia los obtenidos sobre cuatro de los cinco patotipos de *E. coli*, ya que estas bacterias tienen mecanismos de defensa muy variados, los que les permiten ser más virulentas que el resto de las bacterias evaluadas (Quintero-Zarate *et al.*, 2012; Rodríguez-Ángeles, 2012).

La Grampositiva *S. epidermidis* resultó inhibida por el extracto metanólico de hojas con las concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/d, teniendo zonas sin crecimiento de 7, 9 y 11 mm respectivamente, resultados diferentes a los reportados por López Gómez (2012) ya que con la concentración de 10 mg/d reporta una zona sin crecimiento de 8.1 la cual es menor a lo descrito en la presente investigación.

El efecto antibacteriano de los extractos etanólicos permite señalar que los de hoja y corteza de tallos inhibieron a tres de las cuatro bacterias Grampositivas ensayadas, mientras que el de corteza sólo a una.

El extracto etanólico de hojas deshidratadas inhibió a las tres bacterias Grampositivas, *S. epidermidis* y *B. subtilis* con un halo promedio de 7 y 7.33 mm con la más alta concentración (10 mg/d), resultado que difiere con el reporte de Boopathi *et al.* (2017) quienes obtuvieron un halo de 21 mm frente a la segunda cepa en concentración de 1 mg/d. En *S. aureus* no tuvo crecimiento con las tres

concentraciones probadas (2.5, 5 y 10 mg/d), las zonas sin crecimiento presentaron un promedio de 7.33, 8 y 9.66 mm respectivamente, mientras que Boopathi *et al.* (2017) reporta para este mismo extracto y bacteria una zona de 17 mm con una concentración de 1mg/d.

Mientras que en esta investigación con el material vegetal extraído con etanol no se presentaron zonas de inhibición en ninguno de los microorganismos Gramnegativos evaluados, Boopathi *et al.* (2017), reportan que el extracto etanólico de hojas de *T. stans* fue activo frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* con halos de 14 y 10 mm respectivamente en concentración de 1 mg/d, estas diferencias quizás se deban a que previamente el material vegetal seco se extrajo con éter de petróleo, disolvente que permite que las grasas se separen del resto de los componentes y así, al obtener después extractos de polaridad alta no hay lípidos que puedan interferir con la difusión del extracto (Campos Mondragón, s/f), aunado a ello los extractos los obtuvieron con calor.

Cabe recalcar que *S. aureus* fue la cepa más susceptible de todo el experimento, misma a la que se le realizó la CIM y la CBM, con los extractos de cortezas de tallos obtenidos con etanol y metanol arrojó un valor de 0.625 mg/mL y de 0.312 mg/mL respectivamente, en ambos casos el efecto fue bactericida, es decir, el valor de la CIM es igual al de la CBM, lo que demuestra el potencial biológico del extracto para inhibir a esta bacteria.

Así mismo el extracto metanólico de cortezas presentó un efecto bactericida sobre el patotipo EIEC con un valor de 0.625 mg/mL, sin embargo, este mismo extracto fue bacteriostático frente a *S. aureus* (CIM= 0.3125 y CBM= 0.625 mg/mL). Es importante mencionar que los extractos son un cúmulo de compuestos, los que no se encuentran aislados como en el caso de los antibióticos y por tanto existen interacciones entre los compuestos (sinergismo o antagonismo) efectos que repercuten en el potencial antibacteriano de los mismos (Neu, 1992).

Se sabe que la actividad biológica de las plantas es dada por los MS que éstas producen, las pruebas fitoquímicas señalan que se identificaron solo algunos

grupos bajo las condiciones en que se realizó este ensayo. Se identificó en *T. stans* un grupo reducido de MS en todos los órganos empleados, siendo estos: lactonas sesquiterpénicas, fenoles, taninos condensados, saponinas y glucósidos, en diferentes intensidades de reacción, de los cinco, el primer grupo coincide con lo reportado por Ibarra *et al.* (2009) y Kumar (2017), mientras que del segundo al quinto son indicados por Anburaj (2016); Namde y Wani (2014) y Boopathi *et al.* (2017), quienes solo reportan en sus manuscritos la estructura y el disolvente utilizado para obtener los extractos.

Los resultados anteriores no coinciden con los de López Gómez (2012) para hojas y tallos ya que ella además reporta alcaloides y flavonoides tipo flavona pero en etapa de floración-fructificación. Estas diferencias pueden obedecer a diversas causas, entre ellas se pueden citar época del año, hora y etapa fenológica en la que fue recolectado el material vegetal (Ramos *et al.*, 1998; Anaya-Lang, 2003).

El análisis de identificación de MS de los extractos etanólicos de cortezas de tallos y los etanólicos y metanólicos de cortezas destacan los fenoles en alta intensidad, y en el último también taninos condensados en el mismo nivel de reacción.

Además, las lactonas sesquiterpénicas, los fenoles, los taninos condensados y las saponinas son descritos por Cowan (1999) con efecto antibacteriano, los cuatro presentes en el extracto metanólico de hojas -excepto saponinas-, y que de las 13 bacterias ensayadas inhibió a 11, tres Grampositivas y ocho Gramnegativas (gráfica 3). Por lo que es posible atribuir este efecto de amplio espectro tal vez a la sinergia que se establece entre las lactonas sesquiterpénicas, taninos condensados y a los fenoles, éstos últimos que además están presentes en los seis extractos evaluados. Estos extractos fueron más eficaces que lo anotado por Villarreal *et al.* (2017) ya que indican que sus resultados fueron negativos con respecto a la actividad sobre bacterias.

El segundo extracto con mayor efecto fue el metanólico de cortezas que posee fenoles, taninos condensados y glucósidos e inhibió a siete bacterias, dos

Grampositivas y cinco Gramnegativas. A pesar de que el metanólico de cortezas de tallos tenía los tres tipos de MS anotados sólo inhibió a *S. aureus* y EIEC. El efecto de los MS varía de acuerdo a la fuente, tipo y cantidad de la sustancia activa presente (Valares Masa, 2011).

Los extractos etanólicos de hojas, cortezas de tallos y cortezas del tronco tienen en común fenoles (gráfica 11), y los dos primeros también glucósidos e impidieron el crecimiento de tres de las cuatro bacterias Grampositivas probadas, a diferencia del de cortezas que además de fenoles tiene taninos condensados y saponinas, pero sólo impidió el crecimiento de *S. aureus*, ello tal vez se deba a que la cantidad de los compuestos presentes en este último extracto sea pequeña y por tanto no hubo efecto antibacteriano.

Todo lo anterior permite hacer hincapié en que la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios no es uniforme en toda la planta (Alcantar-Aguirre, 2005; Dueñas-Ricaurte, 2009); además se puede señalar que los factores ambientales tienen influencia en gran parte a la producción de estos MS, es decir, la humedad, la luz, el clima, el suelo, así como la interacción con el fenómeno de herbivoría y estrés hídrico (Anaya-Lang, 2003; Valares-Masa, 2011). Otro punto clave es la etapa fenológica en que la planta fue recolectada, lo cual también puede influir en la producción de metabolitos.

La prueba de toxicidad se realizó con *Artemia salina*, los resultados de este trabajo indican que los extractos etanólicos y metanólicos de hojas y tallos son altamente tóxicos a diferencia de los de cortezas (gráfica 12) que resultan ser no tóxicos puesto que el valor de la CL_{50} es superior a los 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (McLaughlin *et al.*, 1998), cabe mencionar que en el reporte de investigación de Martínez-Báez *et al.*, (2016), señalan que los extractos metanólicos de las partes aéreas de *T. stans* son moderadamente tóxicos con una CL_{50} de 362 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque la estructura vegetal que ellos reportan es diferente.

No se encontró ningún reporte en la bibliografía especializada sobre la toxicidad de esta especie con los extractos evaluados en esta investigación, aspecto

de fundamental importancia, ya que al ser utilizada para tratar algún padecimiento el empleo es continuo y a veces por periodos de tiempo prolongados, por tanto es vital esta información, para poder definir la seguridad en el uso medicinal (BDMTM, 2009a).

Los extractos evaluados de las diferentes estructuras de *T. stans* demostraron tener actividad antibacteriana de manera variada, pues hubieron extractos (metanólicos de hojas y de cortezas) que inhibieron a más cepas (11 y siete respectivamente), y el efecto de las concentraciones también fue diferente de acuerdo al tipo de extracto. Se puede hacer notar que la susceptibilidad fue mayor en las bacterias Grampositivas, específicamente *S. aureus* (inhibida por todos los extractos) lo cual puede deberse a la pared celular que posee, ya que en las Gramnegativas es muy compleja ya que poseen además una membrana externa que está conformada por lipopolisacáridos la cual a su vez contiene polisacáridos O que funcionan como antígenos, los cuales les dan una mayor resistencia (Tortora *et al.*, 2007).

IX. CONCLUSIONES

De las tres estructuras vegetales empleadas, los extractos de hojas fueron las de mayor rendimiento (22.79%), principalmente el extracto etanólico (15.78%).

El extracto más activo frente a las cepas ensayadas fue el metanólico de hojas al inhibir a 11 bacterias, seguido del metanólico de cortezas que impidió el crecimiento de siete.

El extracto etanólico de cortezas fue el menos activo, ya que solamente inhibió a la Grampositiva *Staphylococcus aureus*.

El extracto metanólico de cortezas de tallos originó las zonas de inhibición de mayor diámetro sobre *S. aureus*, con un promedio de 18.67 mm con la concentración de 10 mg/d.

La bacteria más susceptible fue *S. aureus*, puesto que fue inhibida por todos los extractos ($P=0.0001$), que presentó dosis-dependencia al igual que *S. epidermidis*.

De las bacterias Gramnegativas solo el patotipo EIEC fue inhibido por los extractos metanólicos de las tres estructuras.

Las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, STEC, *Salmonella Typhi* y *Shigella sonnei* no crecieron por el efecto de los extractos metanólicos de hojas y cortezas.

La CIM y la CBM de los extractos metanólico y etanólico de cortezas de tallos frente a *S. aureus* fue de 0.3125 mg/mL y 0.625 mg/mL lo que indica un efecto fue bactericida (CIM=CBM), el mismo efecto que despliega el metanólico de cortezas sobre EIEC (CBM=0.625 mg/mL).

La evaluación fitoquímica reveló la presencia de fenoles, glucósidos, lactonas sesquiterpénicas, saponinas y taninos condensados, los fenoles en las tres estructuras, mientras que las lactonas sesquiterpénicas se observaron únicamente en hojas.

La citotoxicidad más baja se produjo por las cortezas, el etanólico con un valor CL_{50} de 2 127.34 $\mu\text{g/mL}$ y el metanólico de 3 697.27 $\mu\text{g/mL}$. Los extractos de hojas y cortezas de tallos presentaron una alta toxicidad.

X. LITERATURA CITADA

- Akaniro-Ejim, N. E.; Ubani, S. C.; Nubila, I. N.; Nzei, A. A.; Nwodo, U. U.; Okoh, I. A. 2016. Evaluation of saponin extract from *Vitex doniana* and *Pentaclethra macrophylla* for antibacterial activity. *Applied Sciences*. 6 (180): 1-10.
- Al-Azzawi, A.; Al-Khateeb, E.; Al-Sameraei, K.; Al-Juboori, A. 2012. Antibacterial activity and the histopathological study of crude extracts and isolated tecomine from *Tecoma stans* Bignoniaceae in Iraq. *Pharmacognosy Research*. 4 (1): 37-43.
- Alcantar-Aguirre, F. C. 2005. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato. 149 pp.
- Anaya-Lang, A. L. 2003. Ecología química. Editorial Plaza y Valdés. México. 349 pp.
- Anburaj, G.; Marimuthu, M.; Sobiyana, P.; Manikandan, R. 2016. A review on *Tecoma stans*. *International Journal of Engineering Research and Modern Education*. 1: 2455-4200.
- Andrews, J. M. y A. R. Howe. 2011. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66: 2726-2757.
- Anónimo. 2019. Historia y significado de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. <http://todochiapas.mx/chiapas/historia-y-significado-de-la-ciudad-de-tuxtla-gutierrez/945> (Consulta: 08-julio-2019).
- Aracil, B. y J. I. Alós. S/f. *Streptococcus pyogenes* resistente a los macrólidos. Hospital de Móstoles. Control Calidad SEIMC. Móstoles, Madrid. España. <http://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/fenotm.pdf> (Consulta: 03-enero-2019).

- Ara-Roldán, A. 1997. 100 plantas medicinales escogidas: Una guía de plantas de todo el mundo seleccionadas por su valor terapéutico. Editorial EDAF. Madrid, España. 416 pp.
- Argote-Vega, F. M.; Suárez-Montenegro, Z. J.; Tobar-Delgado, M. E.; Pérez-Álvarez, J. A.; Hurtado-Benavides, A. M.; Delgado-Ospina, J. 2017. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Edición Especial No. 2: 52-60.
- Arredondo García, J. L. y R. J. Villivaña Cortina. 2007. Atlas Bacteriológico. Comarketing Editorial, S. A. de C. V. México. 72 pp.
- Ávalos, A. G. y E. C. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*. 2 (3): 119-125.
- Avato, P.; Bucci, R.; Tava, A.; Vitali, C.; Rosato, A.; Bialy, Z.; Jurzysta, M. 2006. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: Structure-Activity relationship. *Phytotherapy Research*. 20: 454-457.
- Azcon-Bieto, Z. y M. Talón. 2008. Introducción al metabolismo secundario. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 651 pp.
- Baos, E. M. 2017. Caracterización y seguimiento de la resistencia a linezolid en *Staphylococcus epidermidis* en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Clínico San Carlos tras la descripción del primer brote de *Staphylococcus aureus* linezolid resistente. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 144 pp.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). 2009a. *Tecoma stans*. UNAM. México. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tronadora&id=7502> (Consulta: 13-septiembre-2018).

- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). 2009b. Hierbamora. UNAM. México. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Hierba_mora&id=7697 (Consulta: 04-enero-2019).
- Blanco, J. 2011. *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. ¡Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC!. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 30 (2): 84–89.
- Blanco, M.; Padola, N.; Krüger, A.; Sanz, M.; Blanco, J.; González, E.; Dahbi, G.; Mora, A.; Bernárdez, M.; Etcheverría, A.; Arroyo, G.; Lucchesi, P.; Parma, A.; Blanco, J. 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*. 7: 269-276.
- Blanco-Sierra, G. M. y G. P. Lainez-Zelaya. 2002. Determinación de la bioactividad citotóxica de extractos de veinticinco especies vegetales mediante el bioensayo con *Artemia salina*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador. 133 pp.
- Boopathi, T.; Gopalasatheeskumar, K.; Parthiban, S.; Sangeetha, G.; Kokila, M.; Manimaran, T. 2017. Evaluation of antimicrobial activity of *Tecoma stans* and *Muntingia calabura*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 6 (3): 617-627.
- Callicó, A.; Cedré, B.; Sifontes, S.; Torres, V.; Pino, Y.; Callís, A. H.; Esnard, S. C. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor*. 3 (13): 1-9.
- Campos Mondragón, M. G. s/f. Soxhlet, del inventor al método. <http://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/244-numero-29/450-soxhlet-del-inventor-al-metodo.html> (Consulta: 11-junio-2019).

- Carretero-Accame, M. E. 2000. Compuestos fenólicos. *Panorama Actual Médico*. 24 (232): 340-344.
- Carretero-Accame, M. E. 2001a. Alcaloides: aspectos generales (I). *Panorama Actual Médico*. 25 (241): 222-227.
- Carretero-Accame, M. E. 2001b. Terpenos III: Triterpenos y esteroides. *Panorama Actual Médico*. 25 (240): 124-130.
- Carrión, J. A. y G. C. García. 2010. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 138 pp.
- Cartaya, O. e I. Reynaldo. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22 (2): 5-14.
- Castillo, E. G. e I. S. Martínez. 2007. Manual de fitoterapia. 2^a edición. Editorial Elsevier. Barcelona, España. 1116 pp.
- Castillo, L. and C. Rossini. 2010. Bignoniaceae metabolites as semiochemicals. *Molecules*. 15: 7090-7015.
- Castro-Alvarenga, I. I. y M. M. Cordova-Flamenco. 2003. Investigación de la actividad citotóxica de las fracciones de los extractos de cinco especies vegetales mediante el bioensayo de *Artemia salina*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador. 152 pp.
- Chaiña-Becerra, A. E. 2015. Crecimiento y sobrevivencia de alevinos de *Odontesthes bonariensis* (pejerrey) alimentados con *Daphnia pulex* y nauplios de *Artemia salina* en condiciones controladas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 91 pp.
- Chávez, M. C.; White, O. L.; Moctezuma, P. S.; Herrera, T. F. 2017. Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*. 56 (2): 26-47.

- Chávez-Bravo, E.; Rivera-Tapia, J. A.; Castañeda-Roldán, E. I.; Gil-Juárez, C., Ochoa-Huilot, M. A.; Cedillo-Ramírez, M. L. 2012. Multiresistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* enteropatógena y enterotoxigénica, detectadas en muestras clínicas mediante reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Ciencias Biomédicas*. 3 (1): 40-48.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2018. *Tecoma stans*. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/12-bigno8m.PDF (Consulta: 24-junio-2018).
- Cona, T. E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 19 (2): 77-81.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews*. 12 (4): 564-582.
- Cuca-Suárez, L. E.; Coy-barrera, C. A.; Coy-Barrera, E. D.; Lozano-Moreno, J. M. 2011. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia*. 45 (2): 275-282.
- Cuervo, J. P. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 28 pp.
- Dewangan, N.; Satpathy, S.; Shrivastava, A. K.; Shrivastava, R. 2017. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Tecoma stans* and *Vitex negundo*. *Indian Journal of Scientific Research*. 13 (2): 248-253.
- Díaz-Puentes, L. N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*. 1 (2): 32-55.

- Domingo, D. y M. López-Brea. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Sociedad Española de Quimioterapia*. 16 (4): 385-393.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. 229 pp.
- Dueñas-Ricaurte, J. C. 2009. Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias de la Vida. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí. Ecuador. 83 pp.
- Dupuy, O. L.; Murillo, R.; Bonilla, J. A. 2008. Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *Viguiera sylvatica* y *Decachaeta thieleana* (Astereaceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW. *Revista de Biología Tropical*. 56 (3): 1063-1073.
- Ellermeier, C. D. and J. M. Slauch. 2006. The genus *Salmonella*. *Prokaryotes*. 6: 123-158.
- Faleiro-Naves, P. L. 2010. Formación de biopelículas por "*Escherichia coli*" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 164 pp.
- Farfán-García, A. E.; Ariza-Rojas, S. C.; Vargas-Cárdenas, F. A.; Vargas-Remolina, L. V. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*. 33 (4): 438-450.
- Fonnegra G. R. y R. S. Jiménez. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2ª edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 368 pp.

- Gallardo Alba, C. 2019. Familia Bignoniaceae *Tecoma stans*. El parque de Málaga: Guía botánica. <https://parquedemalaga.ddns.net/tecoma-stans> (Consulta: 14-mayo-2019).
- Gallegos-Zurita, M. 2016. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*. 77 (4): 327-332.
- García del Valle, A. y M. M. Zamudio-Durán. 1998. Manual de microbiología médica. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 25-31 pp.
- Garzón-Ruiz, A. X. y J. A. Gómez-Guerrero. 2007. Evaluación cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922 y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleando buffer fosfatos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 95 pp.
- Gibaja, S. 1998. Pigmentos naturales. Quinónicos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 277 pp.
- Gil-Fortuño, M.; Yagüe-Muñoz, A.; Tirado-Balaguer, M. D.; Lázaro-Santander, R.; Manzanet-Andrés, G. 2013. Aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Typhi en una adenopatía mesentérica. *Revista Española de Quimioterapia*. 26 (2): 162-163.
- Gómez-Barrera, M. 2010. Determinación de actividad anti-inflamatoria de sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea peruviana* y *Calea prunifolia*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 99 pp.
- González, A. S. y D. M. Cecchini. s/f. Intoxicación alimentaria debido a *Bacillus cereus*. Organización Panamericana de la Salud. <http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroetas/modulo2/modulo2r.html> (Consulta: 12-febrero-2019).

- Govindappa, M.; Sadananda, T.; Channabasava, R.; Jeevitha, M.; Pooka, K.; Raghavendra, V. 2011. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical screening of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Phytology*. 3 (3): 68-76.
- Guerra-Centeno, D.; Valdez-Sandoval, C.; Orozco-Acevedo, D.; Fuentes-Rousselin, H. 2016. Guía para la identificación de especies de árboles y arbustos comunes en el agropaisaje de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 206 pp.
- Guida, A. y S. Bagardi. 2003. Actividad antibacteriana de alcaloides de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Ars Pharmaceutica*. 44 (2): 167-173.
- Hermida, Ma. del C. 2007. Guarán amarillo/Lapachillo verde. <https://www.naturalista.mx/taxa/48363-Tecoma-stans> (Consulta: 14-mayo-2019).
- Hernández-Cortez, C.; Aguilera-Arreola, M. G.; Castro-Escarpulli, G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31 (4): 137-151.
- Honorable Ayuntamiento Municipal 1986-1988. 1988. Monografía del municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Ediciones y Publicaciones IDEART S. A. de C. V. México. 311 pp.
- Hunt, J. M. 2010. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine*. 30: 21-45.
- Hurtado-Rico, N. E.; Rodríguez-Jiménez, C.; A. Aguilar-Contreras. 2006. Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora medicinal del municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán, México. *Polibotánica*. 22: 21-50.
- Ibarra, M.; Cantú, P.; Verde, M.; Oranday, A. 2009. Caracterización fitoquímica y efecto hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su relación con la presencia del

cromo como factor de tolerancia a la glucosa. *Información Tecnológica*. 20 (5): 55-65.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. Compendio de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas clave geoestadística 07101. <http://www.inegi.org.mx/> (Consulta: 28-octubre-2018).

Jardín Botánico de Madrid. s/f. *Tecoma*. Biblioteca digital del Real Jardín Británico de Madrid, España. <http://bibdigital.rjb.csic.es> (Consulta: 16-septiembre-2018).

Juárez, R. J.; Castro, J. A.; Jaúregui, F. J.; Lizano, V. J.; Carhuapoma, M.; Choquesillo, F. F.; Félix, M. L.; Cotillo, A. P.; López, P. J.; Jaramillo, R. M.; Córdova, I. A.; Ruíz, R. J.; Ramos, J. N. 2010. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e Investigación*. 13 (1): 9-13.

Jurado, R.; Arenas, C.; Doblás, A.; Rivero, A.; Torre-Cisneros, J. 2010. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*. 10 (52): 3475-3537.

Kuklinski, C. 2003. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. Barcelona, España. 515 pp.

Kumar, P. D. and N. M. Patel. 2010. Pharmacognostic and phytochemical investigations of the leaves of *Tecoma stans* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3 (1): 70-72.

Kumar, R. 2017. Preliminary phytochemical screening analysis and therapeutic potential of *Tecoma stans* (L.). *International Journal of Applied Chemistry*. 13 (1): 129-134.

Kumar, S.; Ananditha, S.; Srinidhi, B.; Pramukhya, E. 2018. A review on *Tecoma stans*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 5 (1): 206-208.

- Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares. 2017. Bignoniaceae Juss. Departamento de Ecología y Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. <http://thecompositaehut.com/> (Consulta: 16-septiembre-2018).
- Layton, C.; Maldonado, E.; Monroy, L.; Corrales, L C.; Sánchez, L. C. 2011. *Bacillus spp.*, perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Ciencias Biomédicas*. 9 (15): 113-214.
- Leiva-Guzmán, M. A. 2006. Materiales de referencia y comparaciones interlaboratorios. Herramientas para el control de la calidad en laboratorios de ensayo. Fundación Centro Nacional del Medio Ambiente (CENMA). Santiago de Chile, Chile. 109 pp.
- León-Ramírez, S. 2002. Shigelosis (disentería bacilar). *Salud en Tabasco*. 8 (1): 22-25.
- Lizarbe-Iracheta, M. A. 2009. Bacterias y virus ¿Cómo nos defendemos?. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 103 (1): 115-172.
- Llop, A.; Valdés-Dapena, M.; Zuazo, J. 2001. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo 1. Editorial de Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. 550 pp.
- Lock de Ugaz, O. 2000. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Manual de Fitoterapia. Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú.
- Lopardo, H. A., Predari, S. C.; Vay, C. (editores). S/f. Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Bacterias de Importancia Clínica. Volumen I. 297 pp. <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/BACILOS-GRAM-NEGATIVOS-EXIGENTES.pdf>
- López Gómez; L. D. 2012. *Tecoma stans* (L.) Juss ex. Kunth, un recurso antibacteriano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 84 pp.

- López, L. L.; Leyva, E.; García de la Cruz, R. F. 2011. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 42 (1): 6-17.
- López-Alzate, L. M. y M. Salazar-Yepes. 2017. Pucciniales sobre la familia Bignoniaceae en Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 88: 487-495.
- López-Luengo, M. 2002. Flavonoides. *Ámbito Farmacéutico*. 21 (4): 108-113.
- Loyola-Vargas, V. M.; Sánchez-Iturbe, P.; Canto-Canché, B.; Gutiérrez-Pacheco, L. C.; Galaz-Ávalos, R. M.; Moreno-Valenzuela, O. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Sociedad Química Mexicana*. 48: 67-94.
- Machado, B. T.; Leal, C. V.; Amaral, F. A.; dos Santos, R. K.; da Silva, G. M.; Kuster, R. M. 2002. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Sociedade Brasileira de Química*. 13 (5): 606-610.
- Mallolas, J. y J. Vila. 2002. Infecciones causadas por *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Medicine*. 8 (64): 3398-3407.
- Mandal, P.; Sinha, S. P.; Mandal, N. C. 2005. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia*. 76: 462-465.
- Martínez-Báez, A. Z.; Oranday-Cárdenas, A.; Verde-Star, J; Arévalo-Niño, K.; Ibarra-Salas, M. J.; González-González, G. M.; Rodríguez-Garza, R. G. 2016. Estudio preliminar sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 47 (2): 36-44.
- Martínez, E. y C. H. Ramos. 2012. Bignoniaceae Juss. Fascículo 104. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 58 pp.

- Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17 (6): 271-278.
- Martínez-Martínez, A. 2001. Saponinas esteroides. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 23 pp.
- McLaughlin, J. L.; Rogers, L. L.; Anderson, J. E. 1998. The uses of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 32: 513-524.
- Miranda, F. 2015. La vegetación de Chiapas. Tomo I. Edición revisada. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 305 pp.
- Miranda-Martínez, M. 2002. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. 68 pp.
- Mitić-Ćulafić, D.; Vuković-Gačić, B.; Knežević-Vukčević, J.; Stanković, S.; Simić, D. 2005. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Archives of Biological Science Belgrade*. 57 (3): 173-178.
- Molina, L. J. y B. T. Uribarren. 2011. Infecciones por *Shigella*. Departamento de Microbiología y Parasitología-Recursos en bacteriología. Facultad de Medicina. UNAM.
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/shigella.html>
(Consulta: 16-agosto-2017).
- Montoya, V. H. 2008. Microbiología básica para el área de salud y afines. 2ª edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 282 pp.
- Namde, H. and M. Wani. 2014. Callus induction studies and active components and antioxidant activity investigation from leaves and callus of *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5 (2): 604-610.

- Navaneethan, M.; Pravin, Y.; Saranya, M.; Sivakumar, T.; Mohanraj, R. S.; Dhanakkodi, B. 2016. *Tecoma stans* (L.) Juss.ex Kunth (Bignoniaceae) a prospective mosquitocide in the management of zika virus vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*. 5 (4): 869-889.
- Neira, G. A.; Ramírez, G. M.; Sánchez, P. N. 2005. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dental. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 10 (3-4).
- Neu, H. C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 257 (5073): 1064-1073.
- Ocegueda, S.; Moreno, E.; P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*. 62: 12-15.
- Olivas, S. M. 1999. Plantas medicinales del estado de Chihuahua. Volumen I. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Chihuahua, México. 131 pp.
- Oliveros, A. 2013. Papel de los reguladores globales en la expresión de la fimbria *Lpf2* en *E. coli* Enterohemorrágica. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. 46 pp.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2010. Medicina tradicional: definiciones. https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/ (Consulta: 28-febrero-2019).
- Ospina G., L. F. y R. Pinzón Serrano. 1995. Plantas usadas como antidiabéticas en la medicina popular colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 23: 83-94.
- Osuna-Torres, L.; Tapia-Pérez, M. E.; Aguilar-Contreras, A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Universitat de Barcelona. Barcelona, España. 173 pp.

- Pacheco Leal, D. 2001. Bioquímica estructural y aplicada a la medicina. Instituto Politécnico Nacional. México. 381 pp.
- Pachón-Cubillos, D. A. 2009. Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de Biología Tropical Roberto Franco E.B.T.R.B. de la Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio-Meta. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 115 pp.
- Paganini, H.; Verdaguer, V.; Rodríguez, A.; Della Latta, P.; Hernández, C.; Berberian, G.; Pinheiro, J.; Rosanova, M. 2006. Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños provenientes de la comunidad en niños de la Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 104 (4): 295-300.
- Paiva de Sousa, C. 2006. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. *Revista de Biología e Ciências da Terra*. 6 (2): 341-352.
- Patriota, L.; Procópio, T.; De Souza, M.; Oliveira, A.; Carvalho, L.; Pitta, M.; Rego, M.; Paiva, P.; Pontual, P.; Napoleão, T. 2016. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Frontiers in Microbiology*. 7 (611): 1-10.
- Pavone, P. s/f. Bignoniaceae. Tabla de Botánica Sistemática. Centro Universitario para la Tutela y la Gestión del Ambiente y del Agro-ecosistema. Departamento de Botánica. Universidad de Catania. Italia. http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Bign_fam.html (Consulta: 03-enero-2019).
- Pérez-Alonso, N. y E. Jiménez. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Bioteconología Vegetal*. 11 (4): 195-211.

- Plummer, D. T. 1981. Bioquímica práctica. 2^a ed. Editorial McGraw-Hill Latinoamérica. Bogotá, Colombia. 345 pp.
- Porras-Loaiza, A. P. y A. López-Malo. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3 (1): 121-134.
- Puerta-García, A. y F. Mateos-Rodríguez. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 10 (51): 3426-3431.
- Pumarola, A.; Rodríguez-Torres, A.; García-Rodríguez, J. A.; Piedrola-Angulo, G. 1997. Microbiología y Parasitología Médica. 2^a edición. Salvat Editores. México. 916 pp.
- Quintero-Zarate, J. N.; González-López, J. J.; Coelho, A.; Cornejo, T.; Piedra N.; Andreu, A. 2012. Evaluación de virulencia y patogenicidad de *Escherichia coli* en un modelo murino de infección sistémica. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Elsevier Doyma. España. 367 pp.
- Ramírez Escobedo, M. E.; Barajas L. B.; Pérez, C. B.; Sáenz, A. G.; Silva B., S. Y. 2012. Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43 (4): 7-14.
- Ramírez, O. M. 2017. Propiedades funcionales de hoy. OmniaScience. México. 296 pp.
- Ramírez-Cuenca, M. S. 2005. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México. 86 pp.
- Ramos, G. F. 2014. Cultivo de *Bacillus subtilis* cepa 105 en biorreactor y su actividad antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de Maestría. Centro de

- Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México. 39 pp.
- Ramos, G.; Frutos, P.; Giráldez, F. J.; Mantecón, A. R. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Archivos de Zootecnia*. 47 (180): 597-620.
- Rípodas N. A.; Fernández, M. D.; Macho, M. 2017. Investigación de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar*. 73 (3): 147-152.
- Rivas-Gonzalo, J. C. y M. García-Alonso. 2002. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 9 (2): 31-38.
- Rivera-Núñez, D. y C. Obón de Castro. 2007. Manual de teoría y prácticas de etnobotánica. Capítulo 8. Editores Murcia. España. 55-66 pp.
- Rivero, M.; Padola, N.; Etcheverría, A.; Parma, A. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina*. 64: 352-356.
- Rodríguez, L. M. 2012. De enfermedades y remedios: la transmisión oral del uso doméstico de plantas con fines medicinales en Campeche, México. *Apuntes*. 25 (1): 62-71.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44 (5): 464-475.
- Rojas, P. 2008. Estudio de prevalencia y genotificación de *Escherichia coli* enterotoxigénica aislado en comunidades de Esmeraldas. Tesis de Maestría. Colegio de Pogrados. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador. 94 pp.

- Romero-Cabello, R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. 1802 pp.
- Romeu-Álvarez, B. 2012. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. 98 pp.
- Ruddock, P. S.; Charland, M.; Ramirez, S.; López, A.; Neil Towers, G. H.; Arnason, J. T.; Liao, M.; Dillon, J. A. 2011. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*. 38 (2): 82-88.
- Ruíz, L. M. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis Doctoral. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Barcelona, España. 156 pp.
- Salazar, R. y C. Soihet. 2001. Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina. Volumen II. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 159 pp.
- Saleh, M.; Kamel, A.; Li, X.; Swaray, J. 1999. Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. *Pharmaceutical Biology*. 37 (1): 63-66.
- Salem M., Z. M.; Gohar Y., M.; Camacho, L. M.; El Shanhorey N. A.; Salem, A. Z. M. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (5): 418-426.
- Sánchez de Lorenzo-Cáceres, J. M. 2015. *Tecoma stans* Juss. ex Kunth. Ayuntamiento de Murcia. España. https://www.murcia.es/medio-ambiente/parquesyjardines/material/Arbol_mes_2015/2015_05%20Tecoma%20stans.pdf (Consulta: 03-enero-2019).

- Sánchez-Pérez, J. P. 2014. Cuantificación de sesquiterpenlactonas totales procedentes del extracto clorofórmico de hojas de *Calea urticifolia* (juanislama) recolectadas en el periodo correspondiente de julio a diciembre de 2012. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 154 pp.
- Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 42 (4): 321-324.
- Secretaría de Desarrollo y Medio Ambiente (SEDUMA). 2012. Xk'anlol. Flora. Ficha técnica. <http://www.seduma.yucatan.gob.mx/flora/fichas-tecnicas/xkanlol.pdf> (Consulta: 23-junio-2018).
- Senthilkumar, C.; Suresh , K.; Rajasekara, M. 2010. In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts from *Tecoma stans* (L) Juss. et Kunth, *Coleus forskohlii* and *Pogostemon patchouli* against human pathogenic bacteria. *International Journal of PharmTech Research*. 2 (1): 438-442.
- Sepúlveda-Jiménez, G.; Porta-Ducoing, H.; Rocha-Sosa, M. 2003. La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (3): 355-363.
- Sibón, O. A.; Sánchez, R. E.; Barrera, P. E.; Soriano, M. M.; Fernández, R. A.; Moro, C. C. 2017. Shock séptico por *Streptococcus pyogenes* en un niño. ¿Es posible el diagnóstico en patología forense?. *Cuadernos de Medicina Forense*. 23 (1-2): 35-40.
- Slabbinck, B.; De Baets, B.; Dawyndt, P.; De Vos, P. 2010. Análisis de *Pseudomonas* fitopatógenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: Un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género *Pseudomonas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28 (1): 1-16.

- Sowjanya, P. and B. Srivinasa. 2017. Phytochemical investigation and antimicrobial properties of crude flower extract of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Der Pharmacia Lettre*. 9 (7): 140-149.
- Sunitha, K.; Ganapaty, S.; Sridhar, Y. 2016. Constituents from the leaves of *Tecoma stans* Juss. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4 (12): 272-274.
- Tereschuk, M. L.; Quarenghi, M. V.; González, M.; Baigorí, M. D. 2007. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes* del Noa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 6 (6): 364-366.
- Thakur, L.; Sitapara, N.; Sheth, N. 2012. Identification and standardization of *Tecoma stans* Linn through transverse section, phytochemical investigation and powder characteristics determination of roots. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4 (3): 484-486.
- Threlfall, E. J. and L. R. Ward. 2001. Decreases susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serotype Typhi, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*. 7 (3): 448-450.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 959 pp.
- Tropicos.Org. 2018. *Tecoma stans*. Jardín Botánico de Missouri (JBM). <http://www.tropicos.org/Name/3700024> (Consulta: 25-junio-2018).
- Universidad de Buenos Aires. s/f. Familia *Enterobacteriaceae*. <http://www.fcv.unl.edu.ar/arquivos/grado/catedras/bacteriologia/informacion/clases/ENTEROB06.ppt> (Consulta: 11-febrero-2019).
- Valares Masa, C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Universidad de Extremadura. Badajoz, España. 216 pp.

- Varela; G.; Jasinski, C.; Gadea, P.; Tanzi, M; Mota, M.; Arenas, C.; Pardo, L.; González, S.; González, G.; Sirok, A.; Schelotto, F. 2007. *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Revista Médica del Uruguay*. 23: 153-163.
- Vattem, D. A.; Ghaedian, R.; Shetty, K. 2005. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 14 (2): 120-130.
- Vidal, J. E. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*. 9 (1): 188-193.
- Vidal, J. E.; Canizález-Román, A.; Gutiérrez-Jiménez, J.; Navarro-García, F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*. 49 (5): 376-386.
- Villarreal, S.; Moreno, S.; Jaimez, D.; Rojas-Fermín, L.; Lucena, M.; Díaz, T.; Carmona, J. 2017. Actividad antibacteriana y antioxidante de extractos crudos de plantas pertenecientes a la familia Bignoniaceae. *Acta Bioclínica*. 7 (14): 205-222.
- Vuong, C. and M. Otto. 2002. *Stapylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*. 4: 481-489.
- Winn, W. C.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Koneman, E. W.; Procop, G. W.; Schrenckenberger, P. C.; Woods, G. L. 2008. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1691 pp.
- Zamora, N. 2011. Biodiversidad de Costa Rica. *Tecoma stans*. Santo Domingo de Heredia. Costa Rica. <http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Tecoma%20stans> (Consulta: 25-enero-2019).

Zampini, I. C.; Cudmani, N.; Isla, M. I. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales Argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 41 (3): 385-393.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Rendimiento de los extractos de *T. stans*.

Estructura vegetal	Disolvente	Peso del extracto (mg)	Rendimiento por extracto (%)	Rendimiento total (%)
Hojas	Etanol	7 890.80	15.78	22.79
	Metanol	3 505.20	7.01	
Cortezas de tallos	Etanol	2 650.30	5.30	8.22
	Metanol	1 457.80	2.92	
Cortezas	Etanol	559.20	1.12	2.49
	Metanol	686.90	1.37	

Anexo 2. Efecto inhibitorio de los extractos de hojas de *T. stans*.

Etanol															
BACTERIA	2.5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	10 mg/d			Prom. (mm)	D.E.
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EPEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EIEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EAEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
STEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	7	8	7	7.33	0.58	8	9	7	8	1	10	10	9	9.66	0.57
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	7	7	7	7	0	7	7	7	7	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	8	7.33	0.57
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol															
BACTERIA	2.5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	10 mg/d			Prom. (mm)	D.E.
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	9	8	9	1
EPEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	8	7.33	0.57
EIEC	0	0	0	0	0	7	7	7	7	0	7	7	7	7	0
EAEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7	0
STEC	0	0	0	0	0	7	7	7	7	0	9	8	9	8.66	0.57
<i>S. Typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	9	10	9	1
<i>S. sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7	9	8	1
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	7	7	7	7	0	9	8	7	8	1
<i>S. epidermidis</i>	7	7	7	7	0	8	9	10	9	1	11	10	12	11	1
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	7	7	8	7.33	0.57	8	8	8	8	0
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R1: Repetición 1; R2: Repetición 2; R3: Repetición 3; Prom.: Promedio; D.E.: Desviación estándar.

Anexo 3. Efecto inhibitorio de los extractos de cortezas de tallos de *T. stans*.

Etanol															
BACTERIA	2.5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	10 mg/d			Prom. (mm)	D.E.
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EPEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EIEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EAEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
STEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. Typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. aureus</i>	12	11	13	12	1	14	14	15	14.33	0.57	15	15	17	15.66	1.15
<i>S. epidermidis</i>	8	8	7	7.66	0.58	11	10	9	10	1	13	12	12	12.33	0.57
<i>B. subtilis</i>	7	7	7	7	0	8	8	7	7.66	0.57	9	9	7	8.33	1.15
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Metanol															
BACTERIA	2.5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	10 mg/d			Prom. (mm)	D.E.
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EPEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EIEC	7	7	8	7.33	0.58	10	9	10	9.66	0.57	11	10	11	10.66	0.57
EAEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
STEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. Typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. aureus</i>	14	13	12	13	1	18	16	16	16.66	1.15	20	18	18	18.66	1.15
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

R1: Repetición 1; R2: Repetición 2; R3: Repetición 3; Prom.: Promedio; D.E.: Desviación estándar.

Anexo 4. Efecto inhibitorio de los extractos de cortezas de *T. stans*.

Etanol															
BACTERIA	2.5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	10 mg/d			Prom. (mm)	D.E.
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EPEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EIEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EAEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
STEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	7	7	7	7	0	7	7	7	7	0	7	7	7	7	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol															
BACTERIA	2.5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	5 mg/d			Prom. (mm)	D.E.	10 mg/d			Prom. (mm)	D.E.
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EPEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ETEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EIEC	10	10	11	10.33	0.58	12	11	13	12	1	14	13	15	14	1
EAEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
STEC	0	0	0	0	0	9	8	8	8.33	0.57	11	9	10	10	1
<i>S. Typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	8	9	8.66	0.57
<i>S. sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	8	7	7.33	0.57
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	7	8	8	1
<i>S. aureus</i>	9	11	11	10.33	1.15	12	14	13	13	1	16	17	16	16.33	0.57
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	8	7	8	7.66	0.57	10	9	9	9.33	0.57
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R1: Repetición 1; R2: Repetición 2; R3: Repetición 3; Prom.: Promedio; D.E.: Desviación estándar.

Anexo 5. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de hojas. ANOVA simple y comparación entre las concentraciones por el método Tukey HSD al 95.0 de probabilidad.

Tipo de extracto	Bacteria	Razón F	Actividad significativa P	Prueba de rangos múltiples Tukey HSD				Dosis dependencia
				[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	
Etanol	<i>S. aureus</i>	131.93	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	7.33	Xb	
				5	3	8.0	XXab	
				10	3	9.67	Xa	
Etanol	<i>S. epidermidis</i>	*	*	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				5	3	7.0	Xa	
				10	3	7.0	Xa	
Etanol	<i>B. subtilis</i>	484.00	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	7.33	Xa	
Metanol	<i>E. coli</i>	243.00	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	9.0	Xa	
Metanol	ETEC	484.00	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	7.33	Xa	
Metanol	EIEC	*	*	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				5	3	7.0	Xa	
				10	3	7.0	Xa	
Metanol	EAEC	*	*	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	7.0	Xa	

Metanol	STEC	753.00	0.0001	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	No
				0	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				5	3	7.0	Xb	
				10	3	8.66	Xa	
Metanol	S. Typhi	243.00	0.0001	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	No
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	9.0	Xa	
Metanol	S. sonnei	192.00	0.0001	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	No
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	8.0	Xa	
Metanol	P. aeruginosa	*	*	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	No
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	8.0	Xa	
Metanol	S. aureus	227.00	0.0001	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	No
				0	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				5	3	7.0	Xa	
				10	3	8.0	Xa	
Metanol	S. epidermidis	137.50	0.0001	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Sí
				0	3	0	X	
				2.5	3	7.0	Xc	
				5	3	9.0	Xb	
				10	3	11.0	Xa	
Metanol	B. subtilis	708.00	0.0001	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	No
				0	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				5	3	7.33	Xa	
				10	3	8.0	Xa	

[]: Concentración; *: El programa no generó resultados.

Anexo 6. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de cortezas de tallos. ANOVA simple y comparación entre las concentraciones por el método Tukey HSD al 95.0 de probabilidad.

Tipo de extracto	Bacteria	Razón F	Actividad significativa P	Prueba de rangos múltiples Tukey HSD				Dosis dependencia
				[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	
Etanol	<i>S. aureus</i>	230.83	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	12.0	Xb	
				5	3	14.33	Xa	
				10	3	15.66	Xa	
Etanol	<i>S. epidermidis</i>	206.13	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	7.66	Xc	
				5	3	10.0	Xb	
				10	3	12.33	Xa	
Etanol	<i>B. subtilis</i>	107.93	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	7.0	Xa	
				5	3	7.66	Xa	
				10	3	8.33	Xa	
Metanol	EIEC	278.56	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	7.33	Xb	
				5	3	9.66	Xa	
				10	3	10.66	Xa	
Metanol	<i>S. aureus</i>	230.39	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	13.0	Xb	
				5	3	16.66	Xa	
				10	3	18.66	Xa	

[]: Concentración; *: El programa no generó resultados.

Anexo 7. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de cortezas. ANOVA simple y comparación entre las concentraciones por el método Tukey HSD al 95.0 de probabilidad.

Tipo de extracto	Bacteria	Razón F	Actividad significativa P	Prueba de rangos múltiples Tukey HSD				Dosis dependencia
				[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	
Etanol	<i>S. aureus</i>	*	*	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	7.0	Xa	
				10	3	7.0	Xa	
				2.5	3	7.0	Xa	
Metanol	EIEC	200.14	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	10.33	Xb	
				5	3	12.0	Xb	
				10	3	14.0	Xa	
Metanol	STEC	256.25	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				5	3	8.33	Xb	
				10	3	10.0	Xa	
Metanol	<i>S. Typhi</i>	676.00	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	8.66	Xa	
Metanol	<i>S. sonnei</i>	484.00	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	7.33	Xa	
Metanol	<i>P. aeruginosa</i>	192.00	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				5	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				10	3	8.0	Xa	
Metanol	<i>S. aureus</i>	223.79	0.0001	[]				
				0	3	0	X	
				2.5	3	10.33	Xc	
				5	3	13.0	Xb	
				10	3	16.33	Xa	

Metanol	S. <i>epidermidis</i>	441.83	0.0001	[]	Casos	Media	Grupos Homogéneos	No
				0	3	0	X	
				2.5	3	0	X	
				5	3	7.66	Xb	
				10	3	9.33333	Xa	

[]: Concentración; *: El programa no generó resultados.

Resumen de la susceptibilidad bacteriana a los extractos ensayados. Método Tukey HSD al 95.0 de probabilidad MANOVA.

Bacteria	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<i>S. pyogenes</i>	72	0	0.355314	X
EPEC	72	0	0.355314	X
EAEC	72	0.291667	0.355314	XX
ETEC	72	0.305556	0.355314	XX
<i>E. coli</i>	72	0.375	0.355314	XX
<i>S. sonnei</i>	72	0.638889	0.355314	XX
<i>P. aeruginosa</i>	72	0.666667	0.355314	XX
S. Typhi	72	0.736111	0.355314	XX
STEC	72	1.41667	0.355314	XX
<i>B. subtilis</i>	72	1.90278	0.355314	XX
EIEC	72	3.25	0.355314	XX
<i>S. epidermidis</i>	72	3.66667	0.355314	X
<i>S. aureus</i>	72	7.95833	0.355314	X

P= 0.0001; Razón F= 39.66

Anexo 8. Efecto de cada extracto sobre las bacterias ensayadas. ANOVA simple y comparación entre los extractos por el método Tukey HSD al 95.0 de probabilidad.

Bacteria	Extracto		I	Actividad significativa	Grupos homogéneos				Extracto más efectivo
					Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	
<i>E. coli</i>	Hojas	Etanólico	No	F=3.63 P=0.0700	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
		Metanólico			Metanólico	12	2.25	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	Cortezas	Etanólico	No	*	*				*
Metanólico		No							
ETEC	Hojas	Etanólico	No	F=3.65 P=0.0693	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
		Metanólico			Metanólico	12	1.83	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	Cortezas	Etanólico	No	*	*				*
Metanólico		No							
EPEC	Hojas	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	Cortezas	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
EIEC	Hojas	Etanólico	No	F= 11.00 P=0.0031	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
		Metanólico			Metanólico	12	3.5	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	F=29.94 P=0.0000	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí						

EIEC	Cortezas	Etanólico	No	F=30.69 P=0.0000	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
					Metanólico	12	6.91	X	
					Metanólico	12	9.08	X	
EAEC	Hojas	Etanólico	No	F= 3.67 P=0.0686	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
					Metanólico	12	1.75	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	Cortezas	Etanólico	No	*	*				*
Metanólico		No							
STEC	Hojas	Etanólico	No	F= 10.72 P= 0.0035	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
					Metanólico	12	3.91	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	Cortezas	Etanólico	No	F= 10.71 P= 0.0035	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
Metanólico		Sí	Etanólico		12	0	X		
			Metanólico		12	4.58	X		
S. Typhi	Hojas	Etanólico	No	F= 3.63 P= 0.0700	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
					Metanólico	12	2.25	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
Metanólico		No							

S. Typhi	Cortezas	Etanólico	No	F= 3.63 P= 0.0700	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
					Metanólico	12	2.25	X	
S. sonnei	Hojas	Etanólico	No	F= 3.62 P= 0.0704	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
					Metanólico	12	2.0	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	Cortezas	Etanólico	No	F= 3.65 P= 0.0693	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
Metanólico		Sí	Etanólico		12	0	X		
			Metanólico		12	1.83	X		
P. aeruginosa	Hojas	Etanólico	No	F= 3.67 P= 0.0686	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
					Metanólico	12	2.0	X	
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*				*
		Metanólico	No						
	Cortezas	Etanólico	No	F= 3.62 P= 0.0704	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
Metanólico		Sí	Etanólico		12	0	X		
			Metanólico		12	2.0	X		
S. aureus	Hojas	Etanólico	Sí	F= 2.42 P= 0.1338	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Etanólico=Metanólico
		Metanólico	Sí		Metanólico	12	3.75	X	
					Etanólico	12	6.25	X	

<i>S. aureus</i>	C. Tallos	Etanólico	Sí	F= 0.30 P= 0.5902	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Etanólico=Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	10.5	X	
		Metanólico	Sí		Metanólico	12	12.08	X	
	Cortezas	Etanólico	Sí	F= 5.10 P= 0.0341	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	5.25	X	
		Metanólico	Sí		Metanólico	12	9.91	X	
<i>S. epidermidis</i>	Hojas	Etanólico	Sí	F= 3.90 P= 0.0609	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Etanólico=Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	3.5	X	
		Metanólico	Sí		Metanólico	12	6.75	X	
	C. Tallos	Etanólico	Sí	F= 28.45 P= 0.0000	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Etanólico
		Metanólico	No		Metanólico	12	0	X	
		Metanólico	No		Etanólico	12	7.5	X	
	Cortezas	Etanólico	No	F= 10.73 P= 0.0035	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	0	X	
		Metanólico	Sí		Metanólico	12	4.25	X	
<i>B. subtilis</i>	Hojas	Etanólico	Sí	F= 1.76 P= 0.1978	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Etanólico=Metanólico
		Metanólico	Sí		Etanólico	12	1.83	X	
		Metanólico	Sí		Metanólico	12	3.83	X	
	C. Tallos	Etanólico	Sí	F= 31.57 P= 0.0000	Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Etanólico
		Metanólico	No		Metanólico	12	0	X	
		Metanólico	No		Etanólico	12	5.75	X	
	Cortezas	Etanólico	No	*					*
		Metanólico	No						

S. <i>pyogenes</i>	Hojas	Etanólico	No	*	*	*
		Metanólico	No			
	C. Tallos	Etanólico	No	*	*	*
		Metanólico	No			
	Cortezas	Etanólico	No	*	*	*
		Metanólico	No			

*: El programa no generó datos.

Resumen de la efectividad del extracto sobre el conjunto de las bacterias ensayadas. Método Tukey HSD al 95.0 de probabilidad MANOVA.

Extracto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Etanólico de cortezas	156	0.403846	0.241388	X
Etanólico de hojas	156	0.891026	0.241388	XX
Metanólico de cortezas de tallos	156	1.46154	0.241388	X
Etanólico de cortezas de tallos	156	1.82692	0.241388	XX
Metanólico de hojas	156	2.60256	0.241388	X
Metanólico de cortezas	156	2.60256	0.241388	X

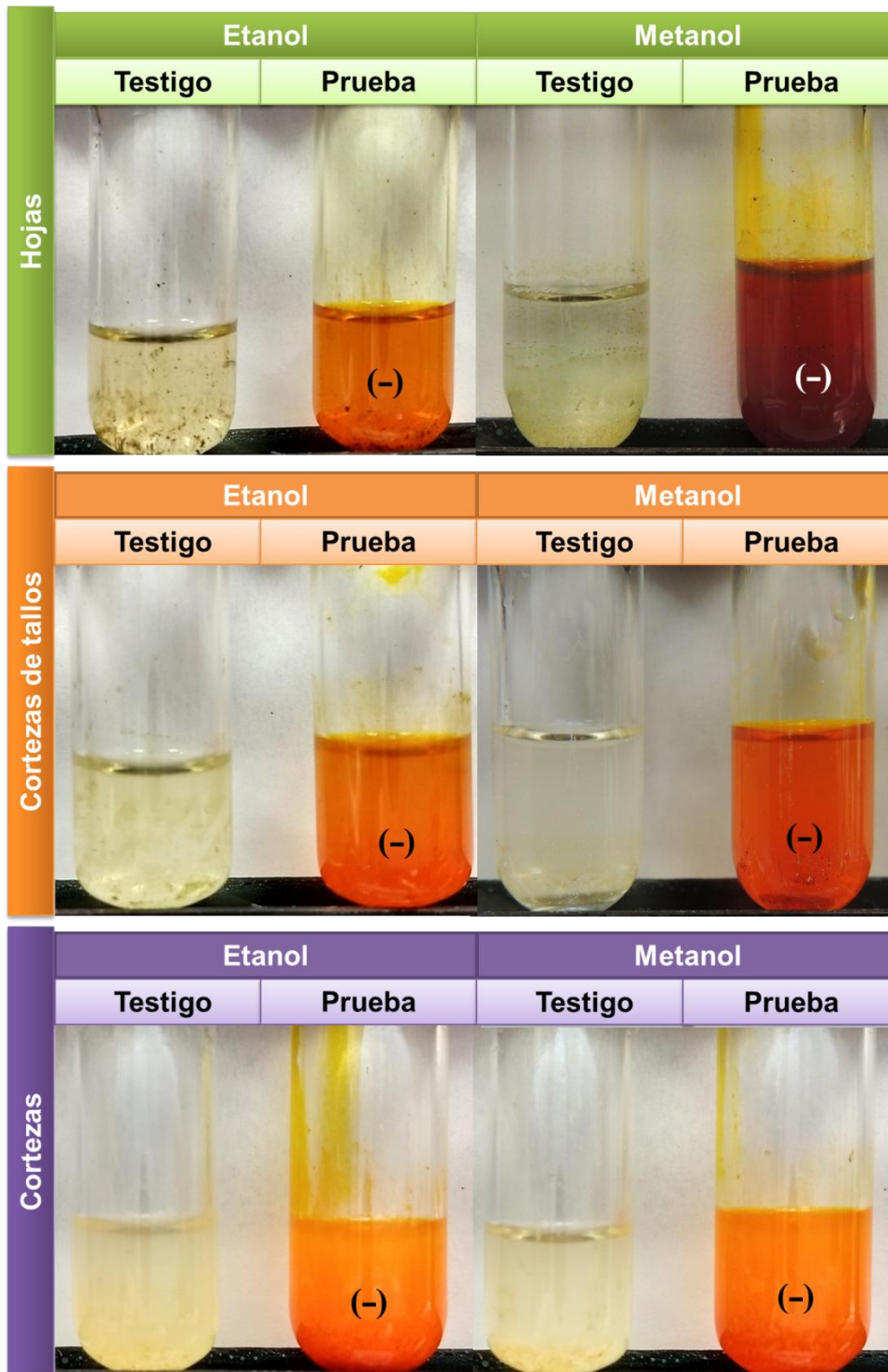
P= 0.0001; Razón F= 13.76.

Anexo 9. Valores de CIM de los extractos obtenidos de cortezas de tallos y cortezas.

Extracto	Bacterias	Controles		Concentraciones (mg/mL)													
		Positivo	Negativo	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195		
Etanólico de cortezas de tallos	<i>S. aureus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
Metanólico de cortezas de tallos		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Metanólico de cortezas	EIEC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

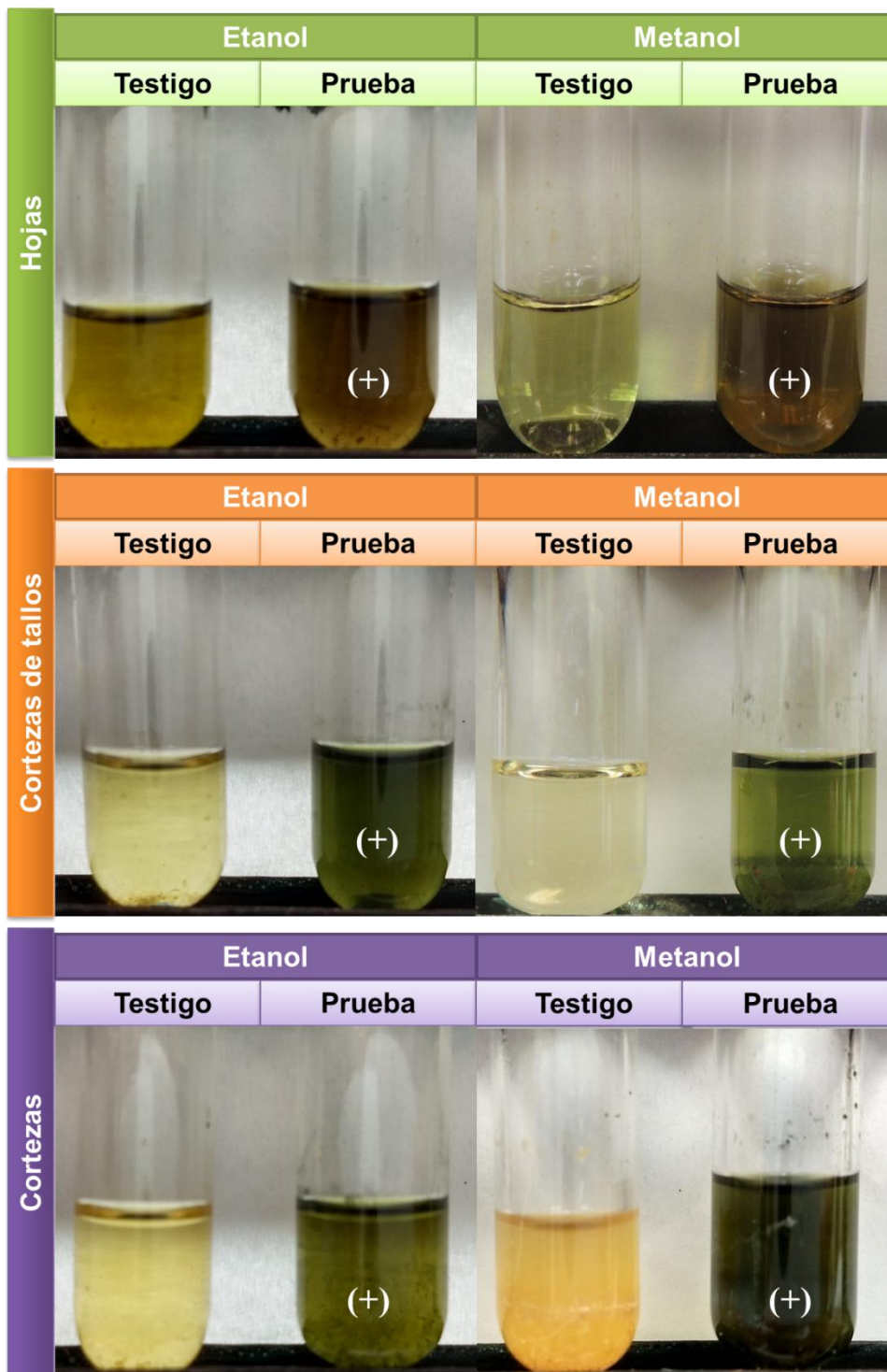
+: crecimiento; -: ausencia de crecimiento

Anexo 10. Resultados de la prueba con el reactivo de Dragendorff para identificar alcaloides.



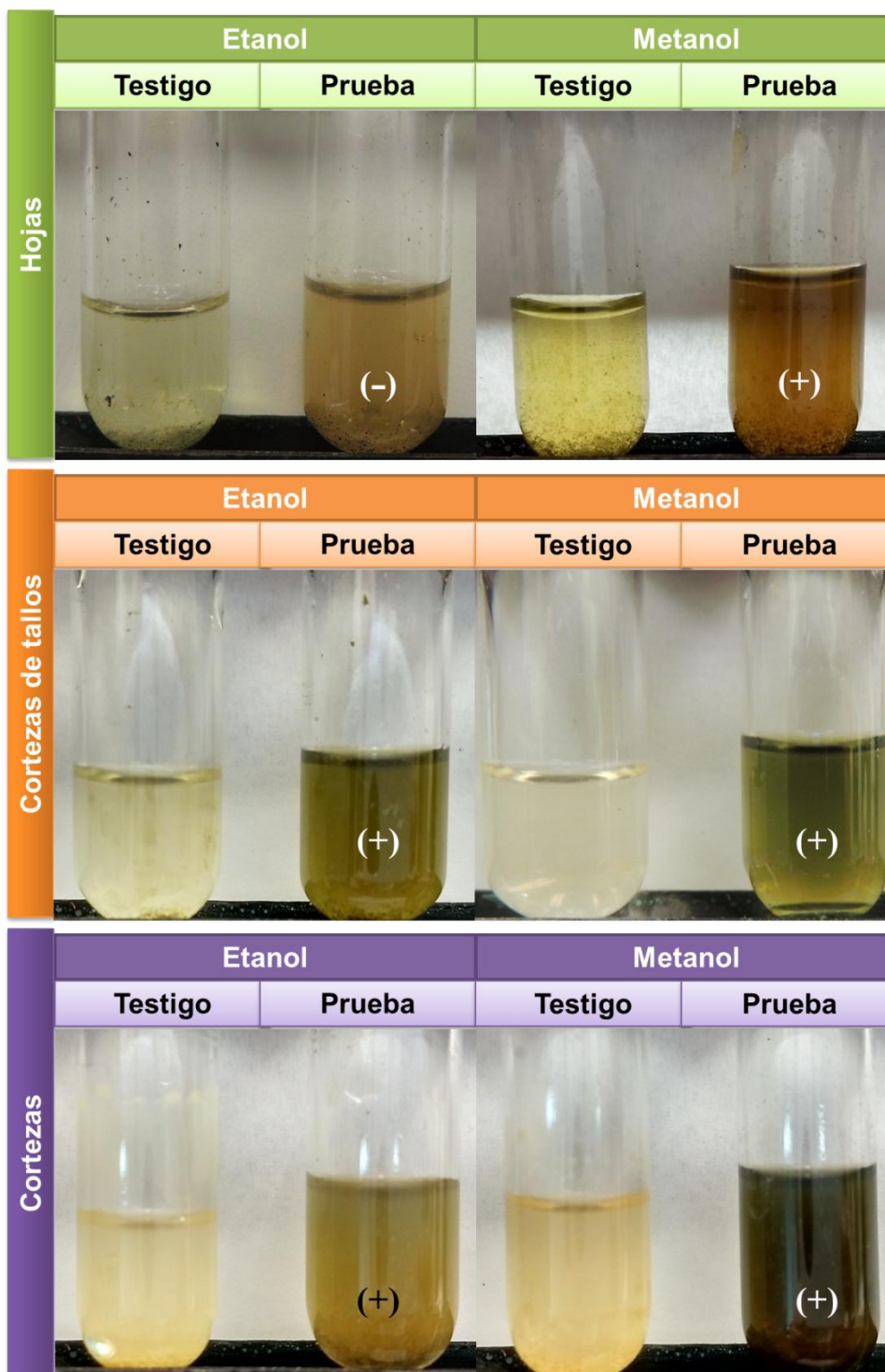
(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 11. Resultados de la prueba de cloruro férrico para identificar fenoles.



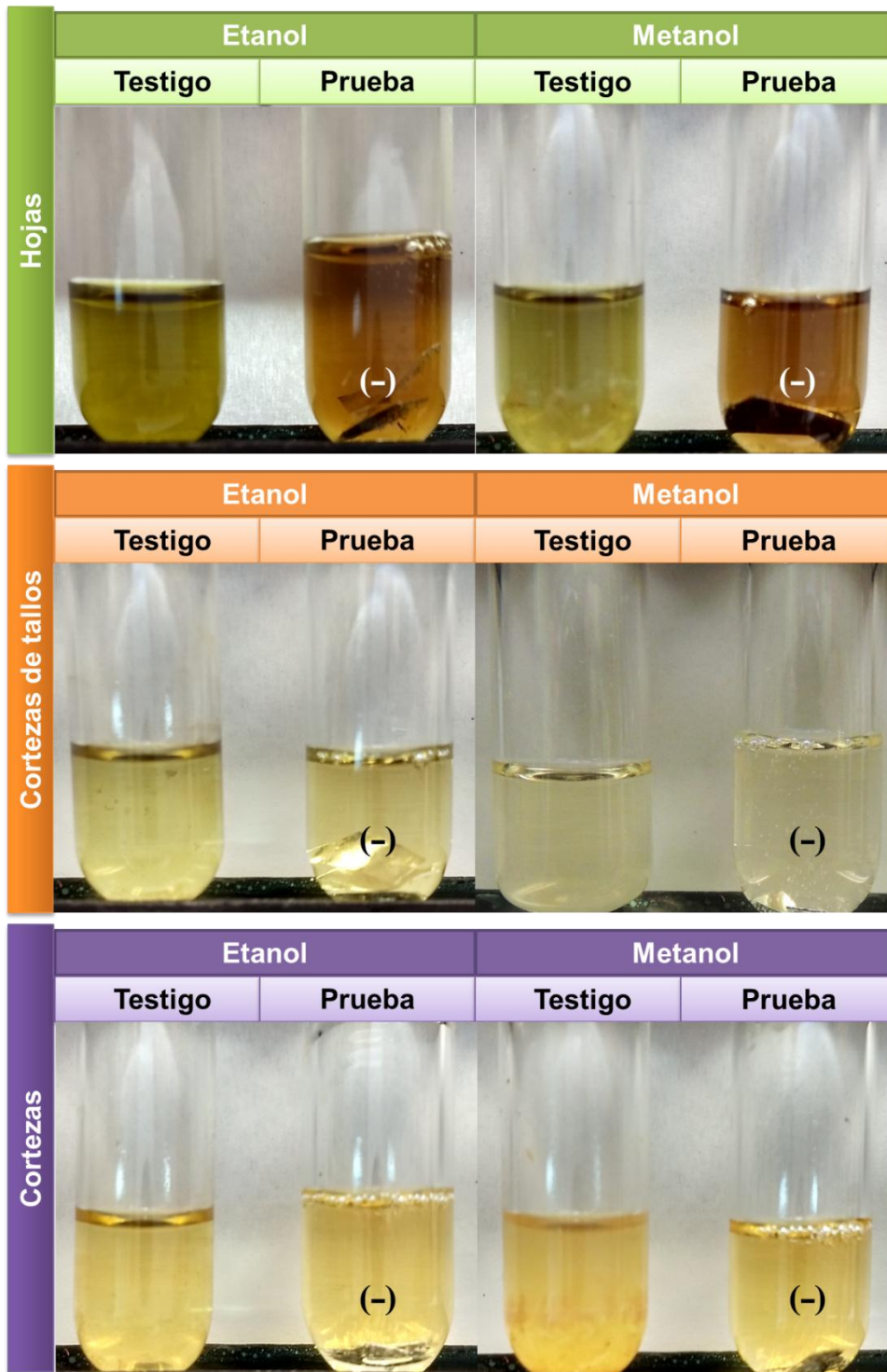
(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 12. Resultados de la prueba para taninos hidrolizables y condensados.



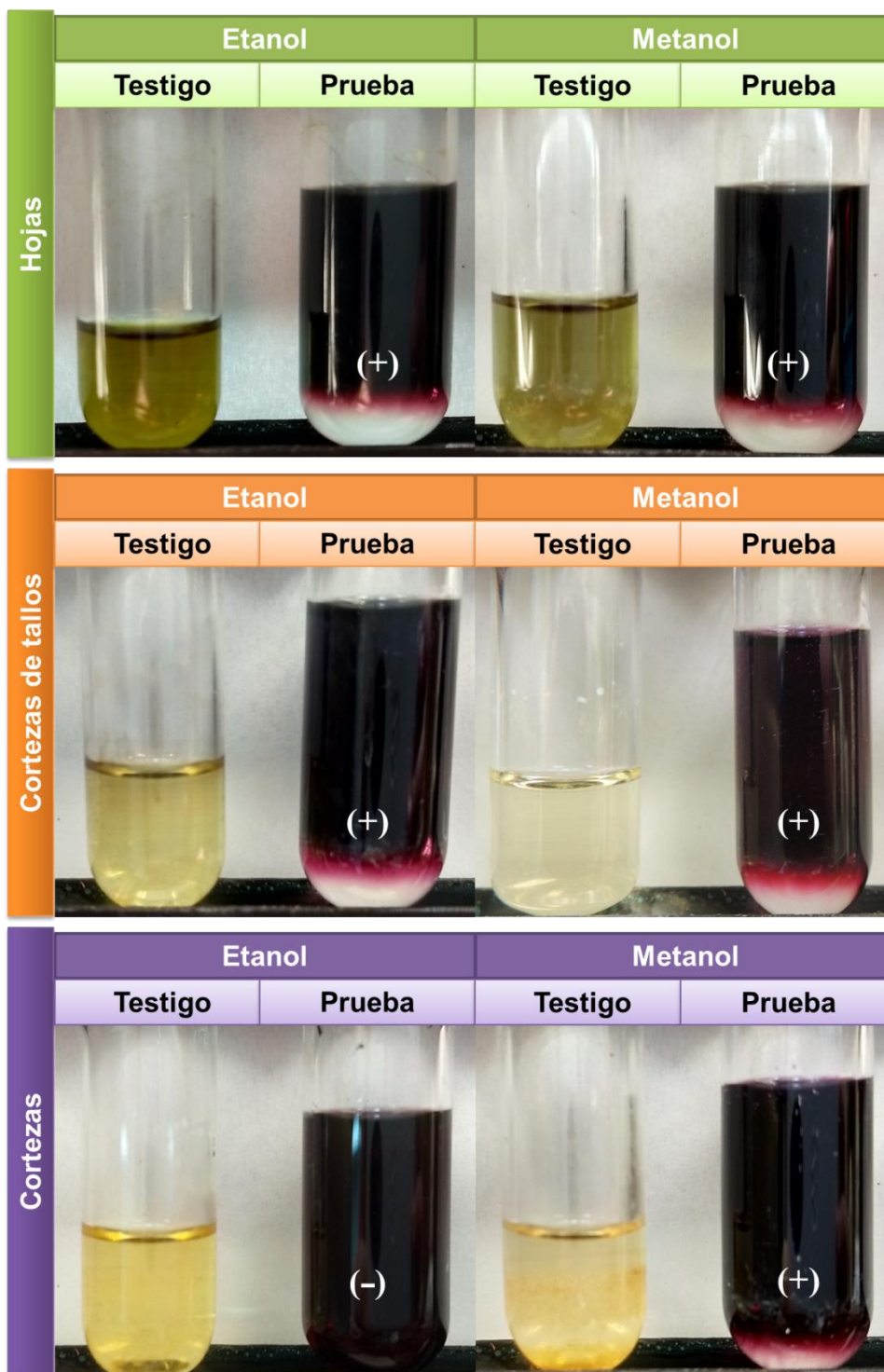
(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 13. Resultados de la prueba de Shinoda para identificar flavonoides.



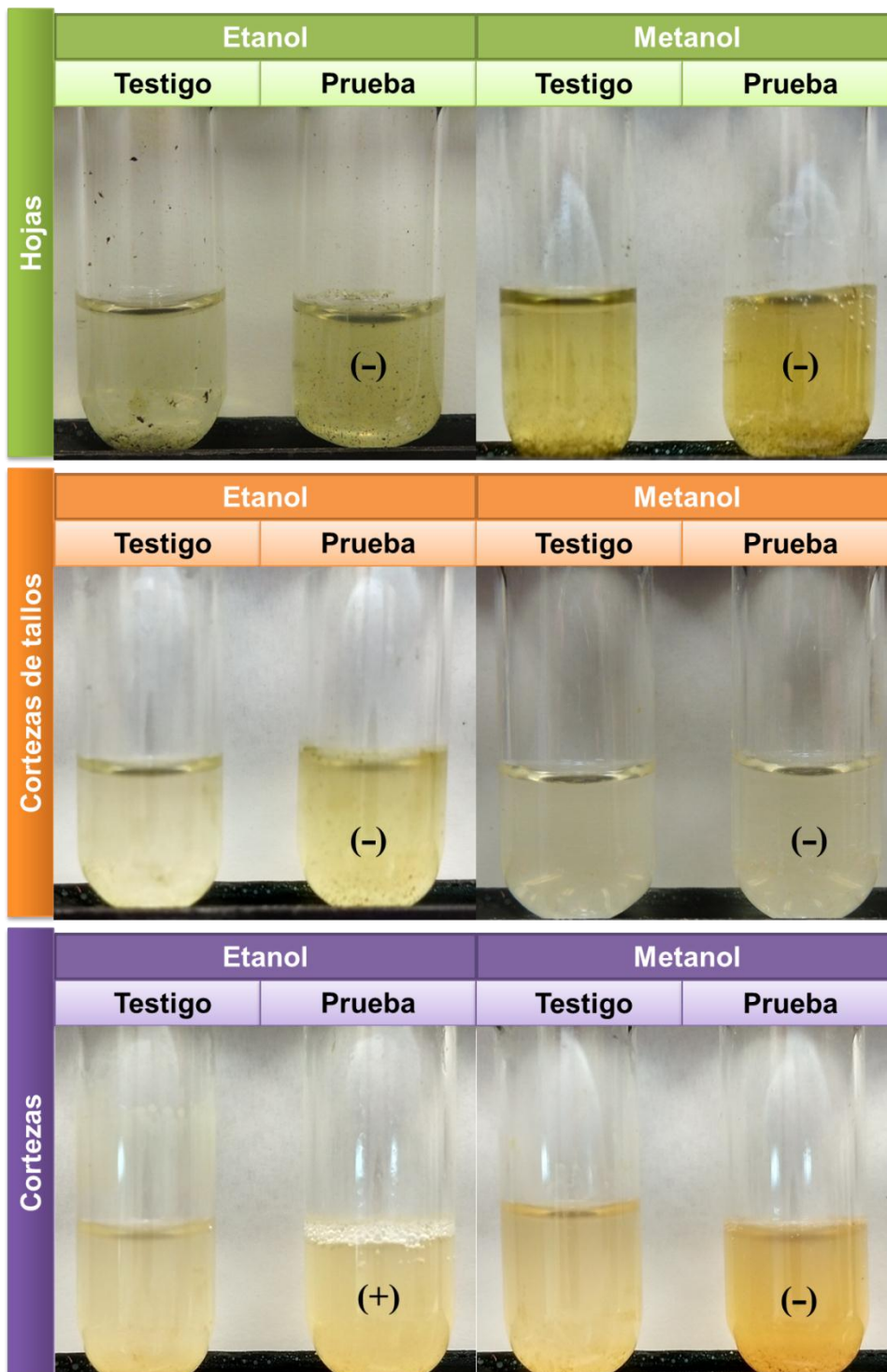
(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 14. Resultados de la prueba de Molish para identificar glucósidos.



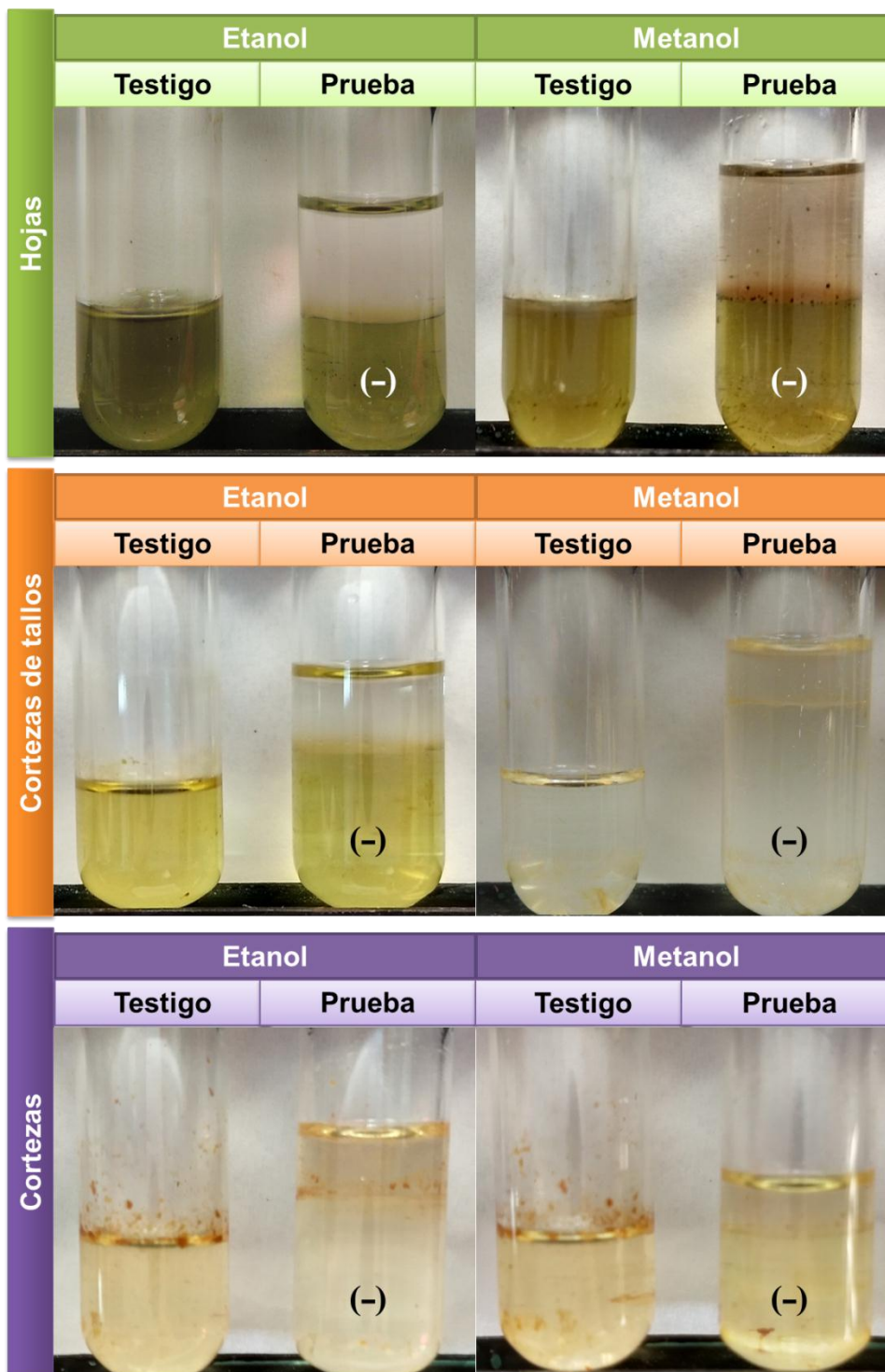
(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 15. Resultados de la prueba de espuma para identificar saponinas.



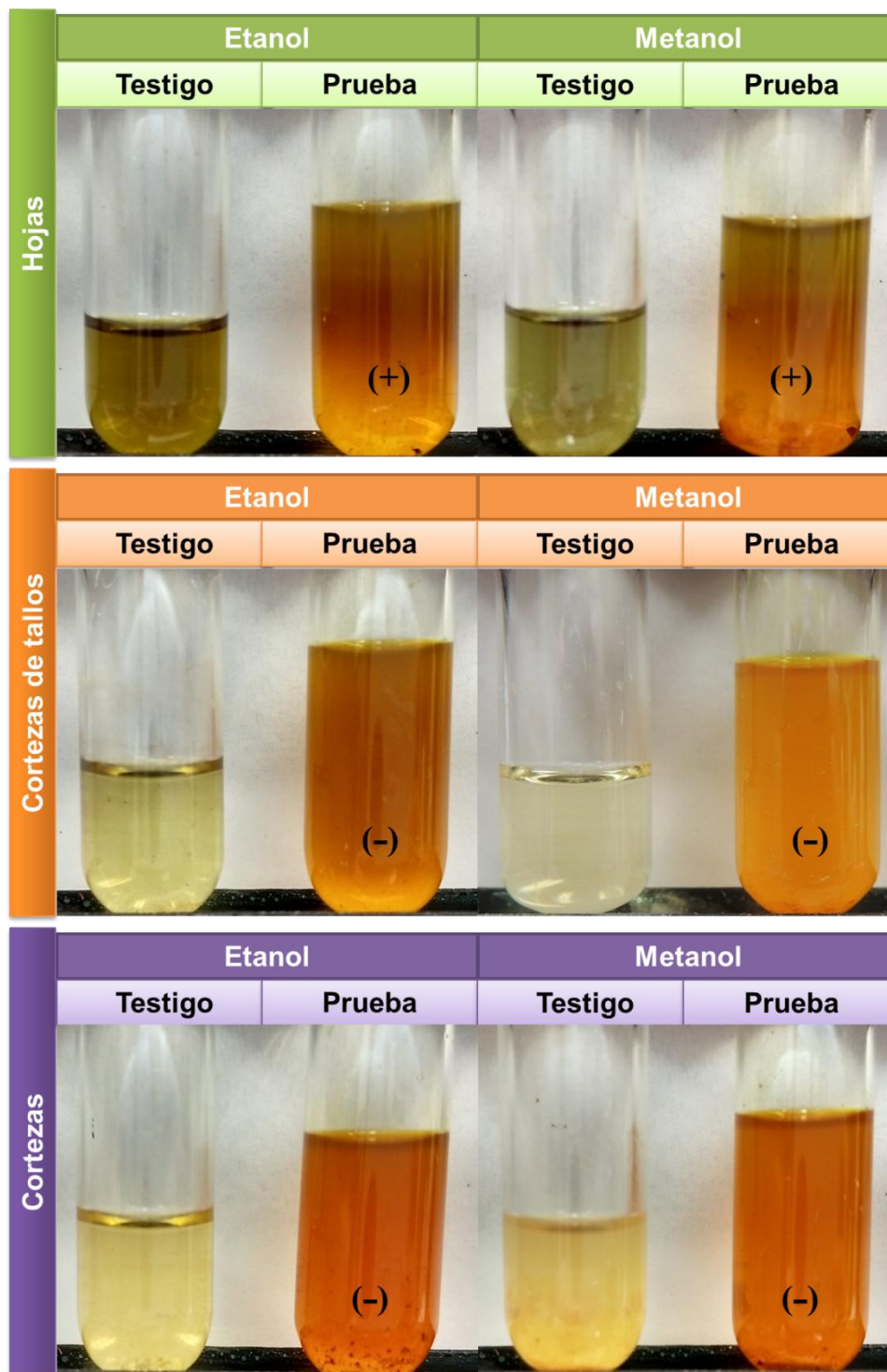
(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 16. Resultados de la prueba de Liebermann-Buchard para identificar terpenos-esteroides.



(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 17. Resultados de la prueba de Baljet para identificar lactonas sesquiterpénicas.



(+) positivo; (-) negativo.

Anexo 18. Concentraciones letales medias de los extractos de *T. stans* con *Artemia salina*. Pruebas Probit.

Extracto	50	80	90	100	Desviación	GI	Valor P
Etanólico de hojas	30.62	45.39	53.11	84.86	14.48	1	0.0001
Metanólico de hojas	55.16	65.43	70.80	92.89	19.09	1	0
Etanólico de cortezas de tallos	55.16	65.43	70.80	92.89	19.09	1	0
Metanólico de cortezas de tallos	55.16	65.43	70.80	92.89	19.09	1	0
Etanólico de cortezas	2 127.34	3 177.29	3 726.12	5 982.54	0.66	1	0.4149
Metanólico de cortezas	3 697.27	5 003.09	5 685.68	8 492.00	0.16	1	0.6925

Anexo 19. Valores de la CL₅₀ de cada extracto.

Extracto	CL ₅₀	Límite inferior 95%	Límite superior 95%
Etanólico de hojas	30.62	*	4.79812
Metanólico de hojas	55.16	*	272.818
Etanólico de cortezas de tallos	55.16	*	272.818
Metanólico de cortezas de tallos	55.16	*	272.818
Etanólico de cortezas	2 127.34	*	809.639
Metanólico de cortezas	3 697.27	*	*

*: El programa no arrojó datos.

Extracto	CL ₁₀₀	Límite inferior 95%	Límite superior 95%
Etanólico de hojas	84.86	*	42.366
Metanólico de hojas	92.89	*	360.412
Etanólico de cortezas de tallos	92.89	*	360.412
Metanólico de cortezas de tallos	92.89	*	360.412
Etanólico de cortezas	5 982.54	*	*
Metanólico de cortezas	8 492.00	*	*

*: El programa no arrojó datos.