

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

T E S I S

**Actividad biológica de los grupos
de metabolitos secundarios
presentes en los pteridofitos
Goniopteris stolzeana (AR Sm.)
Salino y TE Almeida y *Adiantum
amplum* C. Presl.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA
ERIC MONTOYA LÓPEZ**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Marzo de 2022

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

T E S I S

**Actividad biológica de los grupos
de metabolitos secundarios
presentes en los pteridofitos
Goniopteris stolzeana (AR Sm.)
Salino y TE Almeida y *Adiantum
amplum* C. Presl.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

ERIC MONTOYA LÓPEZ

DIRECTORA

**Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres
Instituto de Ciencias Biológicas**





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 19 de enero de 2022

C. Eric Montoya López

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

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

"Actividad biológica de los grupos de metabolitos secundarios presentes en los pteridofitos

Goniopteris stolzeana (AR Sm.) Salino y TE Almeida y *Adiantum amplum* C. Presl."

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. Dolores Guadalupe Vidal López

M. en C. Ana Guadalupe Rocha Loredo

Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres

Firmas:

Three handwritten signatures in blue ink are placed over three horizontal lines. The signatures are cursive and appear to be 'Dolores Vidal', 'Ana Rocha', and 'Lorena Luna'.

Ccp. Expediente

AGRADECIMIENTOS

A los docentes del Instituto de Ciencias Biológicas por la formación académica recibida.

Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación de Chiapas por otorgarme la beca de "Tesis de Licenciatura".

A los dueños de la Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre "La Tasajera", por permitirme la recolecta del material vegetal y su apoyo en todo momento.

A la Doctora Lorena Mercedes Luna Cazárez, quien desde el momento en que me dio la primera clase supe que quería trabajar con ella, le agradezco por aceptarme como su tesista, por todas las enseñanzas, consejos que me dio, por los conocimientos que me transmitió, así como por el tiempo y la paciencia dedicados durante todo el tiempo que duró la realización de este trabajo. Siempre le estaré agradecido por todo lo que me enseñó, por esos momentos en que me animaba a seguir adelante, la admiro y la quiero mucho, siempre estaré dispuesto a seguir aprendiendo de usted.

A la Doctora Dolores Guadalupe Vidal, por las sugerencias y valiosos comentarios que realizó a este trabajo, ayudando a enriquecerlo.

A la Maestra Ana Guadalupe Rocha Laredo, quien desde un principio me transmitió ese interés por los helechos y los musgos, haciéndome un amante de esos grupos de plantas, le agradezco enormemente por haberse tomado el tiempo y dedicación para ayudarme con la identificación de los ejemplares para el herbario, por las sugerencias y observaciones realizadas a esta investigación. Siempre estaré feliz de trabajar con usted, le tengo un enorme respeto y admiración, le guardo un enorme cariño.

Al Dr. Miguel Ángel Pérez Farrera y a la Biol. Josefa Anahí Espinoza Jiménez del Herbario Eizi Matuda del Instituto de Ciencias Biológicas por la corroboración de la identificación taxonómica de los helechos empleados en este trabajo.

DEDICATORIAS

*A mis padres **Mónica Mireya López Jiménez** y **Oscar Montoya Guillen**, y a mi hermana **Karla Enevir Montoya López**, por todo el apoyo brindado, cariño y paciencia desde inicios de la carrera hasta la culminación de este trabajo, los quiero y no hay manera de poder agradecerles todo lo que han hecho por mí.*

*A mi abuela **María Elene Jiménez Hernández** y mi abuelo **Rodolfo López López**, que si bien ya no pudieron verme en esta etapa de mi vida, siempre me deseaban lo mejor y me enseñaron cosas que me ayudaron a seguir adelante y llegar hasta el día de hoy. Los quiero mucho, siempre los tendré presente.*

*A todos **mis familiares** que me apoyaron y confiaron en mí, y me animaron a seguir adelante. Gracias por todo su cariño.*

*A la **Maestra Cecilia Hernández Tondopó**, quien me apoyó en todo momento durante la realización de esta investigación, me tuvo mucha paciencia pues me brindó su tiempo, conocimientos, y siempre estuvo ahí ayudándome en todo momento. Es alguien que ama lo que hace y eso lo trasmite, la quiero mucho maestra.*

*A todos los **integrantes del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal**, a quienes admiro mucho, e hicieron del tiempo de estar ahí un enorme placer, por la convivencia y conocimientos que me brindaron, siempre les tendré un enorme cariño. Los voy a extrañar.*

*A todos **mis amigos y amigas** que forman parte de mi vida, con quienes he compartido muchos momentos a lo largo de mi vida, y a aquellos que conocí en la carrera, con quienes sin duda nos une más que una amistad, sino una misma pasión.*

Y a ti...

Baila al compás de la lluvia, pequeño helecho, y vuelve a extender tus palmas otra vez, y di: “Aunque el sol haya hilado mi vestidura, se ha esforzado en vano, excepto por la sombra que la nube ha hecho, y el regalo del rocío y la lluvia”. Entonces ríe, levántate y sube todas tus frondas, pequeño helecho, ¡y regocíjate con el ritmo de la lluvia!

*Fern Song
John B. Tabb*



ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. PTERIDOFITOS Y SUS GENERALIDADES	3
2.1.1. <i>Goniopteris stolzeana</i> (A.R. Sm.) Salino & T.E. Almeida.....	5
2.1.2. <i>Adiantum amplum</i> C. Presl	6
2.2. METABOLITOS SECUNDARIOS	7
2.2.1. Fenoles o polifenoles (PF)	9
2.2.1.1. Fenoles simples	11
2.2.1.2. Flavonoides	11
2.2.1.3. Ácidos fenólicos	13
2.2.1.4. Taninos	14
2.2.2. Terpenos.....	18
2.2.2.1. Lactonas sesquiterpénicas o sesquiterpenlactonas.....	22
2.2.2.2. Saponinas (triterpenos).....	24
2.2.3. Alcaloides	26
2.3. BACTERIAS EMPLEADAS EN LOS ENSAYOS.....	28
2.3.1. Bacterias Gram positivas	29
2.3.1.1. Género <i>Staphylococcus</i>	30
2.3.1.2. Género <i>Bacillus</i>	34
2.3.2. Bacterias Gram negativas.....	35
2.3.2.1. Género <i>Salmonella</i>	37
2.3.2.2. Género <i>Shigella</i>	40
2.3.2.3. Género <i>Escherichia</i>	41
2.3.2.4. Género <i>Pseudomonas</i>	49
2.4. TOXICIDAD.....	51
III. ANTECEDENTES	56
IV. OBJETIVOS.....	61

4.1. GENERAL.....	61
4.2. PARTICULARES.....	61
V. ZONA DE RECOLECTA	62
5.1. TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN.....	63
5.2. CLIMA	63
5.3. SUELO.....	63
5.4. HIDROGRAFÍA	63
5.5. VEGETACIÓN.....	64
5.6. DESCRIPCIÓN DE LA UMA “LA TASAJERA”	64
VI. MÉTODO	66
6.1. MUESTRA VEGETAL	66
6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE MACERACIÓN	66
6.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE DECOCCIÓN	67
6.4. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS (MS).	68
6.5. MICROORGANISMOS EVALUADOS.....	72
6.6. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) (Sarker <i>et al.</i> , 2007).....	72
6.7. PRUEBA DE TOXICIDAD SOBRE <i>Artemia salina</i> (McLaughlin <i>et al.</i> 1998) ..	73
6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75
VII. RESULTADOS.....	77
7.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS	77
7.1.1. <i>Goniopteris stolzeana</i>	77
7.1.2. <i>Adiantum amplum</i>	78
7.2. GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LOS EXTRACTOS	78
7.2.1. <i>Goniopteris stolzeana</i>	79
7.2.2. <i>Adiantum amplum</i>	81
7.3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)	84
7.3.1. <i>Goniopteris stolzeana</i>	84
7.3.2. <i>Adiantum amplum</i>	85
7.4. TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS SOBRE <i>Artemia salina</i>	86
7.4.1. <i>Goniopteris stolzeana</i>	87
7.4.2. <i>Adiantum amplum</i>	87

7.5. METABOLITOS SECUNDARIOS VS. BACTERIAS INHIBIDAS.....	87
VIII. DISCUSIÓN.....	91
IX. CONCLUSIONES	98
X. RECOMENDACIONES.....	100
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	101
XII. ANEXOS.....	131

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Categoría de toxicidad.....	74
Cuadro 2. Grupos de metabolitos secundarios presentes en <i>Goniopteris stolzeana</i> .	79
Cuadro 3. Grupos de metabolitos secundarios presentes en <i>Adiantum amplum</i>	82
Cuadro 4. Valores de CIM producidos por extractos de <i>Goniopteris stolzeana</i>	85
Cuadro 5. Valores de CIM producidos por extractos de <i>Adiantum amplum</i>	86
Cuadro 6. Concentración letal media de los extractos.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Goniopteris stolzeana</i>	5
Figura 2. <i>Adiantum amplum</i>	7
Figura 3. Estructura química del fenol	9
Figura 4. Estructuras básicas de flavonoides y sus tipos	13
Figura 5. Tipos de taninos.....	15
Figura 6. Compuestos provenientes de la hidrólisis de taninos hidrolizables.....	16
Figura 7. Flavan-3-ol. Monómero estructural del que derivan taninos condensados	17
Figura 8. Estructuras de diversos terpenos.....	21
Figura 9. Clases de sesquiterpenlactonas	23
Figura 10. Estructura química de las saponinas.....	24
Figura 11. Envoltura celular de bacterias Gram positivas	29
Figura 12. Envoltura celular de bacterias Gram negativas.....	36
Figura 13. Ubicación de la UMA “La Tasajera”	62
Figura 14. Obtención de los distintos tipos de extractos.	68
Figura 15. Pruebas para identificar grupos de metabolitos secundarios.	71
Figura 16. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	73
Figura 17. Evaluación de la toxicidad de los extractos sobre <i>Artemia salina</i>	75
Figura 18. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>Gonieopteris stolzeana</i>	77
Figura 19. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>Adiantum amplum</i>	78

Figura 20. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de frondas de <i>Goniopteris stolzeana</i>	80
Figura 21. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de rizomas+raíces de <i>Goniopteris stolzeana</i>	81
Figura 22. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de frondas de <i>Adiantum amplum</i>	83
Figura 23. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de rizomas+raíces de <i>Adiantum amplum</i>	84
Figura 24. Inhibición de bacterias y metabolitos secundarios presentes en extractos de <i>Goniopteris stolzeana</i>	89
Figura 25. Inhibición de bacterias y metabolitos secundarios presentes en extractos de <i>Adiantum amplum</i>	90

RESUMEN

En la actualidad las plantas se utilizan para tratar padecimientos de tipo infeccioso y otros trastornos de la salud como las enfermedades crónicas, su efecto se atribuye a una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales son responsables de la actividad biológica de las plantas contra una amplia gama de microorganismos, efecto de gran relevancia sobre todo por la aparición cada vez más frecuente de bacterias resistentes a los antibióticos. Son escasas las investigaciones que se han realizado con pteridofitos, en particular helechos, sin embargo, éstos son usados con fines medicinales en diversos países, por ello se han convertido en el objeto de estudio de algunos investigadores sobre todo en lo relacionado con sus principios bioactivos, ya que de ellos se pueden obtener nuevos compuestos con un posible uso farmacéutico.

Por lo anterior, el propósito del presente trabajo fue evaluar sobre nueve bacterias el efecto de los extractos obtenidos con hexano, acetato de etilo, metanol y agua, de frondas y rizomas+raíces de *G. stolzeana* y *A. amplum*. Los grupos de metabolitos secundarios se identificaron con pruebas colorimétricas y de precipitación, la actividad antimicrobiana se determinó mediante la concentración inhibitoria mínima (CIM) sobre las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* y Gram negativas *Escherichia coli* y su patotipo EPEC, *Shigella sonnei*, *Salmonella Typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. La toxicidad se evaluó mediante la prueba de *Artemia salina*.

Los MS presentes variaron en tipos e intensidad de reacción de acuerdo a la estructura botánica, en *G. stolzeana* se identificaron alcaloides, fenoles, flavona, glucósidos, saponinas, taninos, terpenos y lactonas sesquiterpénicas, y en *A. amplum* alcaloides, fenoles, flavona, glucósidos, saponinas, taninos condensados y esteroides. Los extractos de *A. amplum* de mayor efecto biológico fueron los de acetato de etilo de frondas y rizomas+raíces, que son estadísticamente significativos ($P=0.0001$), y que inhibieron a las nueve bacterias ensayadas, las CIM más baja de todo el experimental, fue de 10 mg/mL, y las bacterias más susceptibles a este helecho fueron *B. subtilis* y *S. sonnei*.

En cuanto a *G. stolzeana* los extractos activos fueron los de MeOH y AcOEt de frondas y rizomas+raíces, los que no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P=0.6164$); las bacterias más susceptibles a los extractos fueron *S. epidermidis* y *S. aureus* inhibidas por cuatro y tres extractos respectivamente. El mayor efecto inhibitorio de *G. stolzeana* fue con el extracto metanólico de frondas sobre la Gram positiva *S. epidermidis* a 20 mg/mL, esto posiblemente fue por la presencia de fenoles, saponinas y alcaloides, mientras que los extractos de acetato de etilo *A. amplum* presentaron las CIM más bajas a 10 mg/mL, con el de frondas sobre *B. subtilis*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, esto se debió tal vez a la presencia de fenoles, y en el de rizomas+raíces la interacción de fenoles, alcaloides y flavonas pudieron haber influido en la ausencia de crecimiento de *S. aureus*, *S. sonnei* y *S. Typhi*.

Los extractos no tóxicos fueron el hexánico de frondas de *G. stolzeana* y los metanólicos y acuosos de las dos estructuras en ambas especies, resultados importantes ya que la forma en que las plantas se consumen en la medicina tradicional es como infusión.

Los resultados muestran actividad antibacteriana *in vitro*, lo que permite identificar el potencial terapéutico de estas dos especies de helechos, aunado a ello se identificaron como extractos no tóxicos los acuosos y metanólicos de ambos pteridofitos.

Palabras clave: **efecto antimicrobiano, etnopteridológicos, helechos, toxicidad de planta medicinal.**

I. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la vegetación con fines medicinales (Gómez-Álvarez, 2012), las que han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia para cubrir diversas necesidades terapéuticas. Se utilizan en la actualidad no solo para tratar padecimientos de tipo infeccioso sino también para otros trastornos de la salud, su efecto se atribuye a una gran variedad de metabolitos secundarios (MS) que producen, que en su mayoría son de bajo peso molecular y gran diversidad estructural (Wink, 2015).

Los extractos vegetales obtenidos de diversas estructuras botánicas son mezclas complejas de diversos metabolitos secundarios los cuales son responsables de la fragancia y de las propiedades biológicas de las plantas, cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antidiarreicos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos. Además, entre sus actividades biológicas se señala el efecto biocida en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoarios (García-Luján *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 1998).

Para tratar enfermedades de tipo infeccioso se han utilizado los antibióticos, pero su uso indiscriminado ha propiciado que las bacterias hayan desarrollado resistencia a los mismos, por lo que en diversas regiones en el mundo se desarrollan investigaciones encaminadas a encontrar especies del reino vegetal que contengan principios de interés para la industria farmacéutica y que sustituyan a los antibióticos (Wallach *et al.*, 2010); sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre el efecto antibacteriano de las plantas se ha realizado principalmente con las angiospermas, más no con pteridofitos. Estos últimos integran un grupo menos extenso y poco estudiado, aunque también se utilizan con fines medicinales en diversos lugares (Cao *et al.*, 2017), lo que sugiere que los MS que producen tienen efecto sobre algunas bacterias de tipo infeccioso.

Lo anterior indica la importancia de realizar estudios fitoquímicos y biológicos de especies vegetales usadas como medicinales, ya que ello posibilita identificar metabolitos que puedan ser utilizados por su acción terapéutica frente a enfermedades causadas por bacterias.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. PTERIDOFITOS Y SUS GENERALIDADES

Los helechos son un grupo de plantas muy antiguo, con una larga historia evolutiva, pues han logrado sobrevivir desde hace alrededor de 400 millones de años hasta nuestros días (Velázquez-Montes y Aguirre-Hernández, 2015), forman parte de un grupo de plantas vasculares que reciben el nombre de pteridofitas (Pérez-García y Reyes-Jaramillo, 1993). Existen terrestres, rupícolas, epífitos, acuáticos y arborescentes (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2009).

Tienen grandes frondas (hojas primitivas), y el esporofito es lo que comúnmente se conoce como helecho (CONABIO, 2009). No producen semillas y difieren de las Bryophytas y de las plantas con semilla por su ciclo de vida (Martínez-Salas y Ramos, 2014).

Su ciclo de vida se caracteriza por presentar alternancia de generaciones independientes, una asexual o esporofítica, que produce esporas y otra sexual o gametofítica que, como su nombre lo indica, forma gametos (Pérez-García y Reyes-Jaramillo, 1993), esta alternancia puede estar acompañada por una multiplicación vegetativa de cualquier generación (Martínez-Salas y Ramos-Hilda, 2014).

La mayoría de las especies se encuentran en zonas tropicales, y es el bosque mesófilo el más rico en este tipo de plantas; le siguen la selva perennifolia, el bosque de pino-encino, la selva caducifolia, los matorrales xerófilos y la vegetación acuática (Riba, 1993 citado en Minjarez y Macías-Rodríguez, 2016). Son, después de las angiospermas, el grupo más diverso de plantas vasculares con casi 9 000 especies y 267 géneros (Minjarez y Macías-Rodríguez, 2016). En México existen 1 014 especies registradas de helechos (alrededor del 10% de la diversidad mundial), de ellas 188 son endémicas; la mayor cantidad de especies se encuentra en los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz; con más de 500 especies registradas, siendo Oaxaca el estado con mayor cantidad de endemismos con 13 especies, seguido de Chiapas con ocho y

en tercer lugar Guerrero y Nuevo León con siete, y Veracruz tiene cinco de esta categoría (Martínez-Salas y Ramos-Hilda, 2014).

Existen 29 familias de helechos registradas en Chiapas, la familia Pteridaceae tiene 26 géneros (Pérez-Farrera *et al.*, 2013) entre ellos el género *Adiantum*, que es uno de los de mayor distribución (Minjarez y Macías-Rodríguez, 2016), las especies del mismo son conocidas por su eficiencia medicinal y se usan tradicionalmente en el tratamiento de diversos padecimientos durante un período prolongado. Es un género grande y diverso de helechos de aproximadamente 150 (Brahmachari *et al.*, 2003) a casi 200 especies, de las cuales, más de la mitad de ellas son de América tropical y crecen a elevaciones de bajas a medias en bosques húmedos o en regiones secas (Minjarez y Macías-Rodríguez, 2016).

De las casi 200 especies de *Adiantum* en América, 35 especies ocurren en México (Minjarez y Macías-Rodríguez, 2016), entre ellas *A. amplum* objeto de estudio en esta investigación.

Mientras que la familia Thelypteridaceae comprenden de 1 000 a 1 200 especies lo que la hace una de las familias de helechos más diversa. Tiene una distribución cosmopolita, y la mayoría se encuentran en regiones tropicales y subtropicales (Salino *et al.*, 2015; Fawcett *et al.*, 2021) y en escasa proporción en zonas templadas. Son helechos terrestres, higrófilos y heliófilos, con numerosos taxones palustres o epipétricos en lechos de torrentes (Ponce, 2007).

La clasificación genérica de la familia aún no está bien definida, ya que varía en la delimitación del número de géneros, según diferentes criterios son aceptados de 1 a 35 géneros (Ponce, 2007). Hasta el 2010, se reconocían dos géneros para el continente americano: *Macrothelypteris*, con una especie, y *Thelypteris*, dividido en cinco subgéneros: *Amauropelta*, *Cyclosorus*, *Meniscium*, *Steiropteris* y *Goniopteris* (Ponce *et al.*, 2010), sin embargo últimas en algunas investigaciones, diversos autores como Almeida *et al.*, (2016), Hassler (2018) y Fawcett *et al.*, (2021) reconocen a *Goniopteris* C. Presl. como género, al cual pertenece la especie estudiada *Goniopteris stolzeana*, siendo *Goniopteris* el segundo género más diverso en el Neotrópico con 115 a 120 especies (Oliveira-Moura *et al.*, 2016; Salino *et al.*, 2016).

2.1.1. *Goniopteris stolzeana* (A.R. Sm.) Salino & T.E. Almeida

Esta especie sinónimo de *Thelypteris stolzeana* A.R. Sm (Salino *et al.*, 2015)(Figura 1), reconocido como género *Goniopteris*, actualmente siendo *Goniopteris stolzeana* (Hassler, 2018). Presenta rizoma erecto; hojas de 25 a 45 cm; pecíolo de 10 a 20 cm por 1-2 mm; lámina de 15 a 25 cm, gradualmente reducida distalmente a un ápice confluyente, pinnatífido; yemas ausentes; pinnas de 8 a 9 pares, incisas 1/2 a 3/4 de su ancho, de 1 a 2 pares proximales ligeramente reducidos y deflexos, angostados en su base; segmentos de 2 a 3 mm de ancho, redondeados a truncados en el ápice; nervaduras con 4 a 6 pares por segmento, el par proximal de los segmentos adyacentes encontrándose con el margen en el seno o justo por encima de él; indumento del envés principalmente con tricomas, 2 a 4 hendiduras, estipitados, y algunos tricomas aciculares sobre el raquis y las costas, el tejido laminar glabro en ambas superficies; soros exindusiados y esporangios glabros (Smith, 1976).

Distribución

De acuerdo a Villaseñor (2016) y, Mickel y Smith (2004) se encuentra en los estados de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca y Veracruz, y según Tropicos.org (2009) es nativa y endémica de México.



Figura 1. *Goniopteris stolzeana*. Fotografía: Montoya López E. (2019).

2.1.2. *Adiantum amplum* C. Presl

Descripción botánica

Hierba terrestre, con rizomas de 3 a 5 mm de diámetro, corto postrado a sub-erectos o compactos, escamas de 0.6 a 1.0 cm de largo, 0.8 a 1.0 mm ancho, linear lanceoladas, margen ciliado-denticulado, pardas a anaranjadas, lustrosas, concoloras. Sus hojas son fasciculadas, erectas; con pecíolos de 1/3 a 1/2 del largo de la hoja, negruzcos, lustrosos y glabros excepto en la base; láminas 3 a 4 pinnadas, de 25 a 60 cm de largo y 25 a 40 cm de ancho, deltadas, glabras en ambos lados, sin idioblastos; raquis negruzco, glabro; pinnas de cuatro a 12 pares, las más grandes de 15 a 35 cm de largo y 10 a 20 cm de ancho, alternas, pecioluladas; pínula acroscópica basal 1 pinnada y no se traslapa al raquis, últimos segmentos de 0.7 a 1.5 cm de largo y 1.0 a 2.5 cm de ancho, flabelados a obovados o rómbicos, lobulados o incisos con base cuneada, peciólulo de 2.0 a 6.0 mm de largo y ensanchado en el ápice en forma de disco plano cuando se caen los segmentos, el color oscuro del peciólulo no pasa hacia la base del tejido foliar, presenta venas libres, bifurcadas, las de los segmentos estériles terminan en regiones no dentadas. Indusios falsos de 1 a 3 mm de largo, reniformes a oblongos, glabros; esporangios formando ocho a 10 grupos de falsos soros por pínula, con poca farina amarilla entre ellos; esporas tetraédricas, superficie lisa, amarillentas (Velázquez-Montes, 2010) (Figura 2).

Hábitat

Bosque tropical caducifolio, en sitios muy húmedos a orillas de ríos, en elevaciones de 680 msnm (Mickel y Smith, 2004; Velázquez-Montes, 2010).

Distribución

Se distribuye de México a Sudamérica. En México se localiza en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Tabasco y Veracruz (Mickel y Smith, 2004; Velázquez-Montes, 2010).

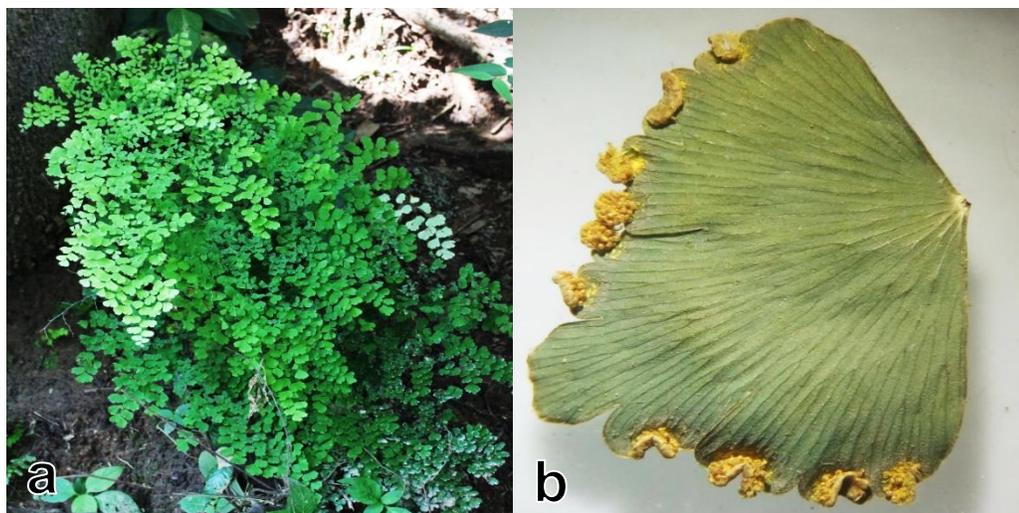


Figura 2. *Adiantum amplum*. a) ejemplar completo; b) pínula con soros. Fotografía: Montoya López E. (2019)

2.2. METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y de energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, denominados metabolitos primarios y secundarios, éste último abreviado como (MS), conocidos también como productos secundarios o productos naturales, los cuales se sintetizan en pequeñas cantidades; estos difieren de los metabolitos primarios en las vías metabólicas de formación y en el hecho de que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, debido a que cada grupo de plantas puede presentar diferentes compuestos (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Existe un extenso repertorio de metabolitos secundarios de distribución común y concentraciones variables en plantas diferentes o familias de plantas, aunque no son moléculas necesarias para el crecimiento y la reproducción de las misma en la actualidad se conoce mucho acerca de ellos, debido al avance en métodos bioquímicos y de biología molecular ha sido posible demostrar que tienen un papel importante en la adaptación de las plantas al ambiente a partir de interacciones ecosistémicas (Vivanco *et al.*, 2005; Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016). Además, de forma indirecta, las plantas dañadas producen algunos metabolitos secundarios que

actúan como sinomonas, que atraen parasitoides y depredadores naturales de los herbívoros que las comen (Castillo-España *et al.*, 2019).

Los productos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario, pero sí tienen una implicación ecológica de defensa, simbiosis y competencia (Thirumurugan, 2018), mientras que otros tienen una función fisiológica para las plantas, como las pectinas que sirven de transporte y compuestos de almacenamiento. En la actualidad los compuestos fenólicos como los flavonoides se utilizan como protectores de rayos ultravioleta, además de ser fuente importante de principios activos de medicamentos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Las condiciones ambientales, así como la cantidad de horas-luz, el clima, la altitud sobre el nivel del mar y el suelo, tienen ingerencia directa en la producción de MS, interfiriendo así en el tipo y cantidad producida de acuerdo a cada condición ambiental en que se desarrollan plantas de la misma especie o de acuerdo a la etapa de desarrollo de la planta, éstos tipos de investigación donde estudian dicha variación son relevantes en la búsqueda de MS que tiene una función ecológica importante que implica una posible utilidad, al igual que aquellos que presentan propiedades medicinales (Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016; Castillo-España *et al.*, 2019).

Por lo tanto, los productos naturales se pueden definir como un grupo heterogéneo de productos metabólicos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo de los organismos productores, pero se consideran compuestos de diferenciación que confieren roles adaptativos, por ejemplo, al funcionar como compuestos de defensa o señalización. Para los humanos son importantes debido a que se pueden utilizar en la alimentación y en el control de diversos padecimientos (Suárez-Medina y Coy-Barrera, 2016; Thirumurugan *et al.*, 2018).

Los compuestos secundarios de las plantas se suelen clasificar según sus vías biosintéticas y generalmente se consideran tres grandes familias de moléculas: fenoles, terpenos y esteroides, y alcaloides (Bourgaud *et al.*, 2001).

2.2.1. Fenoles o polifenoles (PF)

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo y son de los principales metabolitos secundarios de las plantas (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009) (Figura 3).

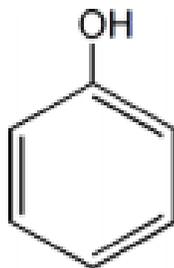


Figura 3. Estructura química del fenol (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Dado que la mayoría de los compuestos que poseen un grupo fenol son potencialmente tóxicos o ambos que forman compuestos y solubles en agua. La mayoría de las clases para la vida, con frecuencia se almacenan en la vacuola de las plantas en conjugación con azúcar, sulfato de fenol ocurren naturalmente como glucósidos y se han descrito muchas formas diferentes (Harborne, 1999).

Existen alrededor de 8 000 PF identificados, los compuestos fenólicos son estructuras aromáticas que llevan uno o más grupos hidroxilo, siendo la mayoría polifenoles, que tienen varios sustituyentes del grupo hidroxilo, uno o más de los cuales pueden estar sustituidos con grupos metilo o glicosilo. y la mayoría de ellos tiene en su estructura tres anillos, A y B que son aromáticos y el C que es un heterociclo oxigenado (Harborne, 1999; Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

El grupo de los fenoles incluye gran variedad de moléculas que pueden ser divididas en varios subgrupos de acuerdo a su estructura básica: los fenoles simples, en donde podemos encontrar al grupo de los flavonoides (C6-C3-C6) que incluyen a chalconas, dihidrochalconas, flavonas, flavononas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, aldehídos derivados de los ácidos benzoicos, que son constituyentes de

los aceites esenciales, los ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinámico y sus derivados) y las cumarinas (Soares, 2002). Y en el rubro de no flavonoides encontramos a los taninos, estilbenos como resveratrol y lignanos (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

Los fenoles son sintetizados de *novo* y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales que intervienen en su síntesis (Gimeno-Creus, 2004). El ácido p-hidroxicinámico, formado a partir de la fenilalanina por desaminación e hidroxilación, ocupa un papel central en la formación de las diversas clases de fenoles en los vegetales (Harborne, 1999).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido malónico que es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores, y la ruta del ácido. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Los fenoles pueden actuar como fitoalexinas y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta, por ejemplo: los antocianos que son responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que tienen las pieles de las frutas y hortalizas. Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable (Gimeno-Creus, 2004). Además de estas funciones, los polifenoles son reconocidos por su remarcada capacidad antioxidante (Valencia-Avilés *et al.*, 2017).

Un mecanismo de acción de los fenoles y los ácidos fenólicos puede ser explicado por el papel que desempeñan en la interrupción de la producción de energía debido a la inhibición de enzimas por parte de los productos oxidados, a través de la reacción con grupos sulfidrilo o mediante interacciones más inespecíficas con las proteínas, como ocurre en el caso de la inhibición de ureasa y la interrupción de la producción de energía por la inhibición de la prolina hidrogenasa en la membrana

plasmática del patógeno gástrico humano Gram negativo *Helicobacter pylori* (Simões *et al.*, 2009).

La actividad antibacterial y antifúngica de los polifenoles se basa en la capacidad que tienen estos compuestos para inhibir el crecimiento, reproducción, respiración, y cualquier otra función vital de los microorganismos. Esta acción la realizan mediante mecanismos como la oxidación de enzimas específicas, que van a inhibir alguna función vital, como la respiración, también se reporta que los polifenoles se pueden unir a las cadenas de ADN interrumpiendo la reproducción o la síntesis de proteínas y elementos vitales para los microorganismos de igual forma, se plantea que algunos polifenoles tienen la capacidad de romper las membranas celulares de algunos microorganismos, produciendo una apoptosis celular (Martín-Gordo, 2018).

2.2.1.1. Fenoles simples

Son compuestos poco frecuentes que se encuentran en las plantas en forma de heterósidos (Rojas-De-Astudillo *et al.*, 2015), estos tienen dos grupos hidroxilo en el anillo aromático en las posiciones 1,2, 1,3, 1,4, o tres en las posiciones 1,3,5 o 1,2,3 (Peñarrieta *et al.*, 2014). Dentro de la clase de fenoles simples están el fenol, el catecol, el resorcinol y el fluoroglucinol, estos fenoles son, en sí mismos, constituyentes infrecuentes de las plantas, pero se pueden encontrar cloroglucinol, resorcinol y catecol en combinación con ácidos que forman varios flavonoides en las plantas (Kougan *et al.*, 2013).

Los derivados de resorcinol, que son compuestos en su mayoría anfífilas, están presentes en muchos cereales. Hay pruebas de que, además de sus propiedades antioxidantes, estos compuestos fenólicos tienen una actividad biológica importante, como antibióticos, antiparasitarios y citotóxicos (Peñarrieta *et al.*, 2014).

2.2.1.2. Flavonoides

Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal, están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cáscaras de las frutas (Vélez-Terranova *et al.*, 2014). Se pueden encontrar en casi

cualquier parte de la planta y lo mismo ocurre con otras moléculas, como los fenilpropanoides y los ácidos hidroxibenzoicos (Harborne, 1999).

Son compuestos polifenólicos que comprenden quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos, que permite su clasificación en función del grado de oxidación del mismos (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Las principales clases de flavonoides son: 1) flavonas (formadas por glicósidos de luteolina y apigenina), 2) flavonoles (que tiene un grupo hidroxilo en la posición 3), 3) flavanonas (enlaces saturados en las posiciones 2-3), 4) flavan-3-ol, 5) isoflavonas (químicamente similares a los estrógenos), 6) antocianidinas (pigmentos, generalmente como glicosidos (Figura 4). La mayoría de los flavonoides se encuentran comúnmente conjugados con azúcares en forma de glucósidos, también es común encontrar grupos hidroxilo en las posiciones 4, 5 y 7 (Granado-Serrano, 2009; Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

Su actividad antibacteriana puede deberse al anillo B de los flavonoides, el cual puede desempeñar un papel en la intercalación o el enlace de hidrógeno con el apilamiento de bases de ácido nucleico, lo que puede explicar la acción inhibitoria sobre la síntesis de ADN y ARN. Un ejemplo claro es la quercetina, se une a la subunidad GyrB de la girasa de ADN de *E. coli* e inhibe la actividad ATPasa de la enzima, este flavonoide causa un aumento en la permeabilidad de la membrana bacteriana interna y una disipación del potencial de membrana (Simões *et al.*, 2009).

En especies de helecho, Ibraheim *et al.* (2011) identificaron tres flavonoides en *Adiantum capillus-veneris* de la fracción de acetato de etilo, que fueron, quercetina, quercetina-3-O-glucósido y quercetina-3-O-rutinósido (rutina). De igual forma, dos flavonoides fueron identificados: rutina y quercetina en *Cheilanthes tenuifolia*, presentando una CIM de 2.25 y 0.45 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter sp.* respectivamente (Jarial *et al.*, 2018a), en otro estudio Jarial *et al.* (2018b) aislaron los flavonoides: gliciridin-7-O-hexósido y quercetina-7-O-rutinósido, keampferol-3-O-rutinosido y miricetina-3-O-ramosido, evaluando la actividad

antibacteriana contra *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo valores de CIM de 0.04, 0.0005 y 0.02 mg/mL con gliricidin-7-O-hexósido y con quercetina-7-O-rutinósido. 6.0, 0.005, 3.1 mg/mL respectivamente.

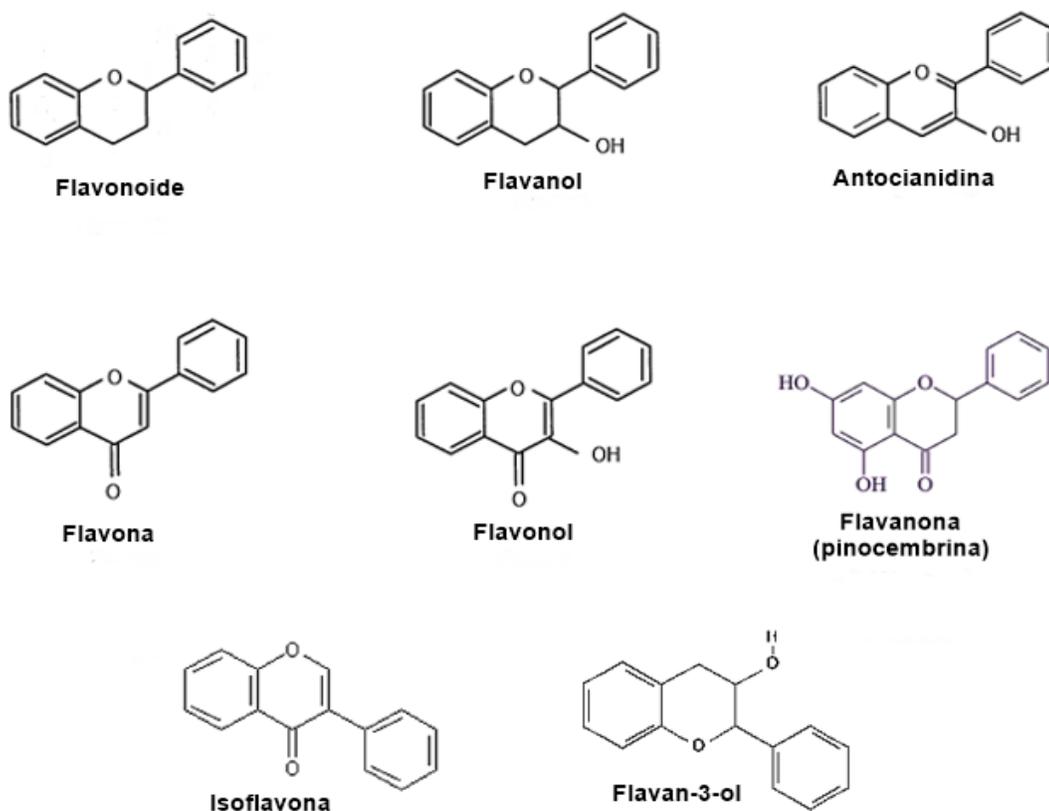


Figura 4. Estructuras básicas de flavonoides y sus tipos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Domínguez-Villegas, 2014; National Center for Biotechnology Information, s.f.).

2.2.1.3. Ácidos fenólicos

En plantas superiores estos ácidos han sido implicados en numerosas ocasiones como agentes alelopáticos, en procesos de resistencia a enfermedades y en situaciones de estrés donde la biosíntesis fenólica es activada en algunos sistemas por factores tales como bajas temperaturas, transporte de agua y otros, de igual forma se sabe que los ácidos fenólicos son precursores de ligninas (Alonso *et al.*, 1993). Se sintetizan por la ruta de los fenilpropanoides, la cual comienza utilizando fenilalanina generada por la ruta del ácido shikimico (Rodríguez-Enríquez, 2008).

Se encuentran en forma libre o conjugada. En frutas y hortalizas están principalmente en forma libre, y en los cereales predominan en forma conjugada o ligada (Reyes-Luengas *et al.*, 2015); se caracterizan por tener un anillo bencénico, un grupo carboxílico y, uno o más grupos de hidroxilo o metoxilo en la molécula, proporcionando propiedades antioxidantes a los alimentos (Soares, 2002).

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Es importante recalcar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos (Peñarrieta *et al.*, 2014).

Sánchez-Maldonado *et al.* (2011), estudiaron la relación entre la estructura de los ácidos fenólicos y su efecto en bacterias ácido-lácticas, *E. coli* y *B. subtilis*. La acción antibacteriana fue distinta para los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. La actividad de los hidroxibenzoicos disminuyó cuando aumentó el número de hidroxilos en el anillo benzoico, es decir cuando aumentó su carácter lipofílico. Para los hidroxicinámicos, el número de hidroxilos en el anillo tuvo un efecto mucho menor, lo cual se atribuyó al marcado poder antibacteriano del doble enlace conjugado de la cadena lateral. Por tanto, si existe una relación estructura química-actividad bactericida.

2.2.1.4. Taninos

Como ya se mencionó, este grupo de moléculas está incluido en los PF o compuestos polifenólicos (CPF), cuyo nombre procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos) (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009), estos compuestos con acción astringentes se encuentran principalmente en la corteza y las hojas, y se limitan principalmente a estos tejidos en las plantas leñosas (Harborne, 1999).

Los taninos son compuestos de alto peso molecular, que confieren al alimento la sensación de astringencia (Soares, 2002) y son solubles en agua. La presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos les brinda la capacidad de formar

complejos principalmente con las proteínas y en menor medida con iones metálicos, aminoácidos y polisacáridos.

Los taninos generalmente son tóxicos debido a su capacidad de unirse a proteínas, por lo que también actúan como repelentes alimenticios de muchos animales como los mamíferos, que evitan plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Esto ocurre en los frutos inmaduros en los que se concentran los taninos en la piel (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Los taninos se dividen en tres grupos: hidrolizables, condensados (Figura 5) y complejos, aunque los dos primeros son los más estudiados (Patra y Saxena, 2011; Olivas-Aguirre *et al.*, 2015).

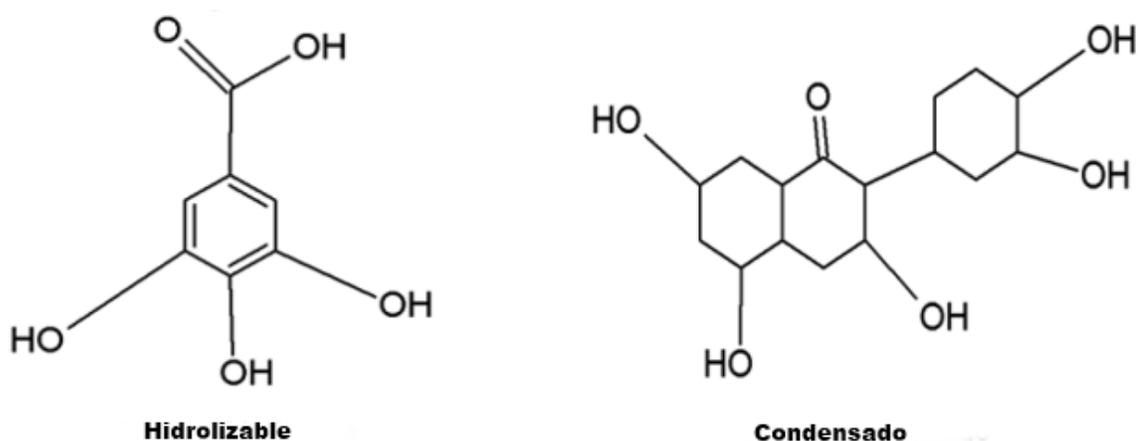


Figura 5. Tipos de taninos (Ghosh, 2015).

Los taninos hidrolizables (TH), llamados también gálicos o pirogálicos, químicamente se definen como: poliésteres de un azúcar (generalmente glucosa), y varias moléculas de un ácido fenol, son moléculas complejas con un poliol como núcleo central los cuales son esterificados parcial o totalmente con un grupo fenólico. Los grupos fenólicos restantes pueden ser esterificados u oxidados para producir más TH complejos (Patra y Saxena, 2011). Después de una hidrólisis ácida se libera ácido gálico o ácido elágico, denominados galotaninos o elagitaninos (Figura 6) respectivamente (Álvarez, 2007).

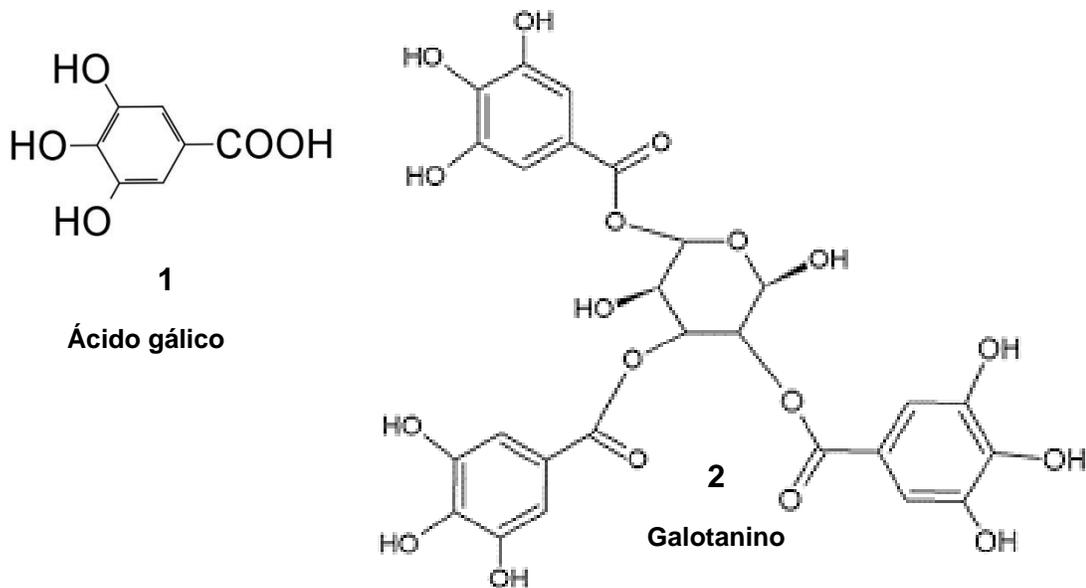


Figura 6. Compuestos provenientes de la hidrólisis de taninos hidrolizables (Benítez-Cruz, s.d.)

Los taninos condensados (TC) o proantocianidinas son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, no contienen azúcar, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas. Tienen la particularidad de liberar, después de una hidrólisis ácida una antocianidina (Harborne, 1999; Álvarez, 2007).

Los TC, son principalmente polímeros de las unidades flavan-3-ol (Figura 7) (epi) catequina y (epi) galocatequina, que están unidos por enlaces interflavonoides C₄-C₈ y C₄-C₆ (Vélez-Terranova *et al.*, 2014). Los flavolanos o taninos condensados son productos finales de esta vía, formados a través de flavanones, flavan 3,4-dioles y flavan-3-ols (Patra y Saxena, 2011).

Las proantocianidinas presentes en el jugo de arándano exhiben actividad antibacterial, impidiendo la adhesión de *E. coli* a superficies celulares del tracto urinario (Prior y Gu, 2005).

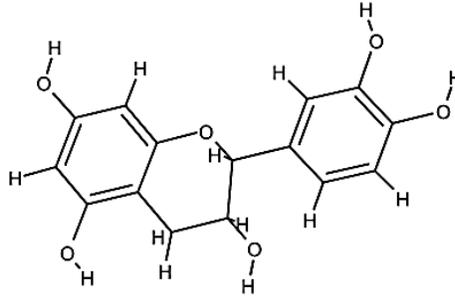


Figura 7. Flavan-3-ol. Monómero estructural del que derivan los taninos condensados (Álvarez, 2007).

La capacidad antibacteriana de los taninos, puede deberse a su interacción con la pared celular bacteriana, haciendo que las colonias bacterianas se desintegren (Doss *et al.*, 2009). Esto es debido a que los taninos pueden formar enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo del enlace peptídico con los grupos hidroxilo de los taninos, con las proteínas que conforman la pared celular, y así estas proteínas serán desnaturalizadas, y consecuentemente el metabolismo bacteriano se ve afectado. Además los taninos también pueden reaccionar con los fosfolípidos que se encuentran en las membranas celulares, que dan como resultado un daño a la membrana celular, provocando la fuga de metabolitos esenciales que inactivan el sistema enzimático bacteriano (Nelce-Mailoa *et al.*, 2014).

La estructura química de los taninos varía cualitativa y cuantitativamente en vegetales y frutas. Aunque algunos taninos son comunes en el reino vegetal, unos son característicos de alguna fruta y otros de algún vegetal en específico; por ejemplo, los taninos condensados abundan en las uvas, sin embargo, en ciertas variedades de *Vitis vinifera* predominan los taninos condensados acilados. Otros factores que afectan la presencia de taninos son las condiciones ambientales, genéticas o estado de maduración del fruto o la planta. Por ejemplo, por cuestiones genéticas, la uva contiene tanto taninos hidrolizables como condensados, estos últimos predominan especialmente en semilla, posiblemente por la mayor expresión de genes de biosíntesis en semilla (Vázquez-Flores *et al.*, 2012).

Las plantas con efecto astringente, como se mencionó, son aquellas que contienen taninos, y de las actividades farmacológicas de los taninos podemos destacar su empleo, tanto por vía interna como tópica. Al aplicar las especies vegetales

(vía tópica) sobre la piel y las mucosas producen que se sequen y constriñan. Actúan precipitando las proteínas de la superficie celular sin afectar a la vitalidad de las propias células. Por vía interna se emplean como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad por cierto efecto antiséptico, ya que precipitan los enzimas extracelulares secretados por los microorganismos causantes de las infecciones, lo que hace que sean de utilidad en diarreas infecciosas (López-Luengo, 2003; Anónimo, 2018).

Poseen también propiedades vasoconstrictoras por lo que se utilizan tanto interna como tópicamente en el tratamiento de afecciones vasculares como varices o hemorroides (disminuye el exudado inflamatorio) y en pequeñas heridas. En uso tópico están indicados en diversos problemas de la piel, empleándose en ciertas dermatosis así como en cosmética como tónicos astringentes (López-Luengo, 2003; Anónimo, 2018).

Igualmente la propiedad astringente del tanino puede inducir la formación de complejos con enzimas o sustratos, debido a que muchas enzimas microbianas en los filtrados de cultivos crudos o en formas purificadas se inhiben cuando se mezclan con taninos; también la complejación de los iones metálicos por los taninos puede explicar la toxicidad de estos (Akiyama *et al.*, 2001).

Muchas plantas ricas en taninos han sido y continúan siendo empleadas en la práctica farmacéutica etnobotánica por muchos pueblos para tratar los problemas de salud a los que se enfrentan (Santana-Romero *et al.*, 2002).

2.2.2. Terpenos

Los terpenos o terpenoides son el grupo de metabolitos secundarios más numeroso y diversificado, en 2014 Renault reporta un registro de 46 000 compuestos se encuentran en muchas hierbas y especias, principalmente en tricomas glandulares de las hojas, en exudados de brotes y en resinas de la corteza de algunas especies (Harborne, 1999). Las familias Myrtaceae y Lamiaceae son conocidas por su alta concentración de terpenos en el follaje (Vilela *et al.*, 2011).

Estos compuestos se derivan de una estructura básica de 5 carbonos (C_5H_8), llamada isopreno (2-metil-1,3-butadieno) por lo que también se conocen como isoprenoides (Vélez-Terranova *et al.*, 2014; González-López *et al.*, 2016). Se sintetizan a partir de dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y bacterias que genera también IPP (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009; Boronat y Rodríguez-Concepción, 2015).

Los terpenoides o isoprenoides tienen propiedades lipofílicas, químicamente son principalmente hidrocarburos insaturados cíclicos aunque pueden arreglarse linealmente (acíclicos), con grados variables de oxigenación en los grupos sustituyentes (alcoholes, aldehídos, cetonas, epóxidos, éteres, ácidos carboxílicos y ésteres) unidos al esqueleto de carbono básico. Pueden encontrarse en forma libre o como glicósidos (saponinas). Se subdividen según la cantidad de isopreno, unidades de cinco carbonos (C_5) que están presentes, las que pueden arreglarse linealmente como el escualeno o cíclicamente como en la limonina (Harborne, 1999; Pérez-Ibañez, 2013).

Se clasifican en: **monoterpenoides** acíclicos y cíclicos (C_{10}) como el geraniol, limoneno, mentol, citronelal; **sesquiterpenos** (C_{15}) cariofileno y bisaboleno; **diterpenos** (C_{20}) como el retinal, el fitol y las Vitaminas α -Tocoferol (E) y K1; **sesterpenos** (C_{25}), de gran variedad estructural como el humuleno obtenido del *Humulus lupulus* L., (-)- α -bisabolon aislado de *Matricaria recutita* L. y α -tumerona *Curcuma longa* L. por ejemplo esteviosido (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl), ginkgólidos (*Ginkgo biloba* L.), paclitaxel o taxol (*Taxus brevifolia* Nutt.), existen sesquiterpenos fuertemente oxidados que tienen grupos lactona. También se han aislado los limonoides C_{26} (que se localizan en la cáscara de frutas cítricas), los butadienólidos C_{24} , los cardenólidos C_{23} (glucósidos cardíacos y cianogénicos) (Harborne, 1999; Martínez, 2003; Pérez-Ibañez, 2013) (Figura 8).

La clase más grande de terpenoides son los triterpenoides o triterpenos (C_{30}), distribuidos en los reinos vegetal y animal, y comparten en común el precursor

escualeno (C_{30}), Los distintos tipos de cierre del anillo en el intermediario acíclico (escualeno) pueden dar lugar a más de un tipo de triterpeno. Se hallan tanto en forma libre como asociada con azúcares que se conocen como saponinas triterpénicas están presentes en las Apiaceae y Pittosporaceae (Almeyda-Cen, 2017). El grupo de terpenos que tiene 40 átomos de carbono son los tetraterpenoides que incluyen al α y el β -caroteno (Harborne, 1999; Martínez, 2003; Pérez-Ibañez, 2013).

Los terpenos más simples (mono- y sesquiterpenos) son los principales constituyentes de los aceites esenciales, son ampliamente utilizados en la industria de la perfumería; en general los monoterpenos hidrocarbonados (felandreno y mirceno) se encuentran en la mayoría de los aceites esenciales vegetales, particularmente de aquellos extraídos de hojas, semillas y flores. En menor medida, se encuentra un grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (López-Luengo, 2004; Bueno-Sánchez *et al.*, 2009; Caputi y Aprea, 2011).

Los aceites esenciales (AE) de las plantas, son mezclas complejas de MS volátiles lipofílicos, obtenidos a partir de las plantas por procesos de destilación a vapor, estos aceites son responsables del sabor y fragancia, y mientras mayor sea la cantidad de oxígeno en las moléculas mayor será su aroma (Peredo-Luna *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2009; Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

Entre los terpenos más abundantes en plantas se encuentran los esteroides, llamados fitoesteroides (Meco-López *et al.*, 2016) como el estigmasterol y el sitosterol, este último sólo difiere del estigmasterol por la ausencia del doble enlace entre C_{22} y C_{23} . La principal función de los esteroides en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad, algunos esteroides tienen funciones protectoras frente a insectos como en el caso de la ecdisoma aislada del helecho común (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

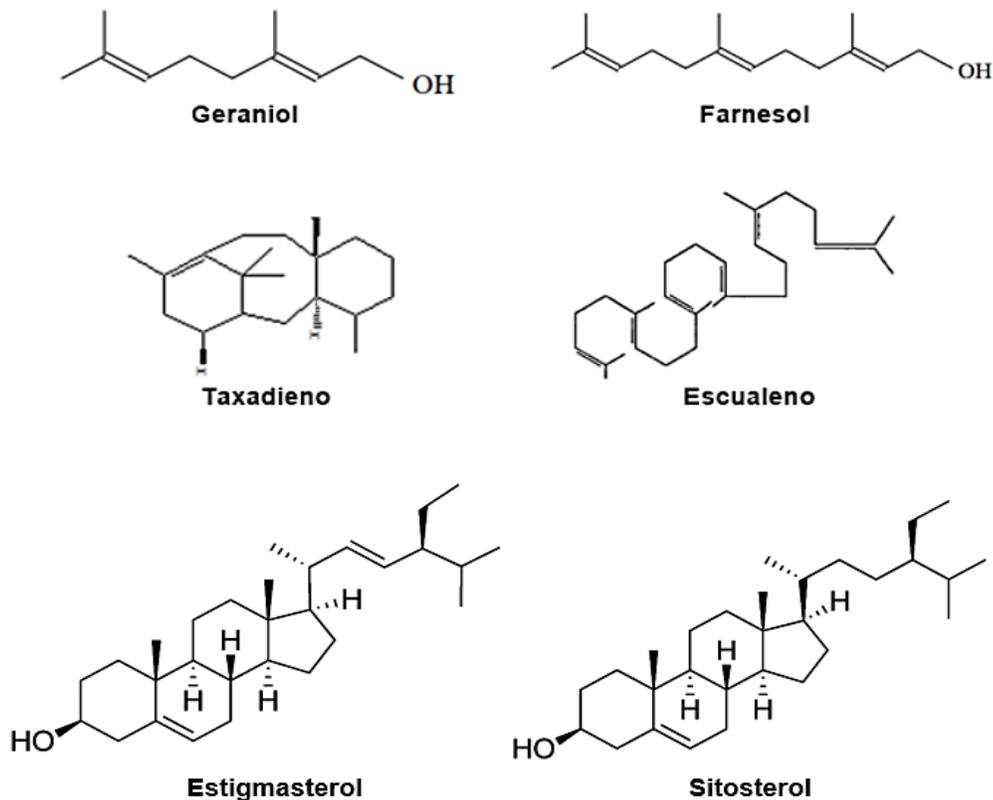


Figura 8. Estructuras de diversos terpenos (Samuelsson y Bohlin, 2009 y Fenaroli, 1968 citado en Pacheco-Jiménez, 2012; Sang *et al.*, 2017; Devlin, 2004; Unidad de Informática del Instituto de Química, 2015).

Farmacológicamente los terpenos tienen acción antibacteriana, antiviral, antipalúdica, antiinflamatoria, antioxidante y antimumoral inhiben la síntesis de colesterol y con actividad anticancerígena. De igual forma estos compuestos han estado involucrados en el proceso de biocontrol, debido a sus propiedades antifúngicas (Hermosa *et al.*, 2014).

Su mecanismo de acción contra las bacterias aún no se entiende completamente, pero se especula que involucra la ruptura de la membrana a través de productos lipófilos, esta acción antibacteriana puede resultar en la expansión de la membrana, aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana, alteración de las proteínas integradas en la membrana, inhibición de la respiración y la alteración de los procesos de transporte de iones tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Simões *et al.*, 2009).

2.2.2.1. Lactonas sesquiterpénicas o sesquiterpenlactonas

Descritas en los tratados antiguos de Materia Médica como “principios amargos”. Llamadas también lactonas sesquiterpenolidas, constituyen un extenso grupo de productos naturales. Se conocen más de 4 500 registros (Pérez-Ibañez, 2013; Ruiz-Reyes y Suárez, 2015). Son sustancias, incoloras, relativamente estables, de carácter lipofílico (Díaz-Flores *et al.*, 1995), amargas que se encuentran en todas partes de las plantas, se derivan de los sesquiterpenos, compuestos lactónicos que se clasifican con base en su esqueleto carbocíclico (Castillo-Olivera *et al.*, 2017).

Se han encontrado en hongos, briofitas, algunas familias como Apiaceae, Magnoliaceae y Lauraceae, especialmente en las Asteráceas (Compositae) donde su presencia es mayoritaria excepto en la tribu Tagetae. En esta última, se localizan frecuentemente en pelos secretores situados en las hojas, tallos y brácteas de la inflorescencia. La mayoría de las lactonas sesquiterpénicas se han aislado de los brotes de la planta, principalmente hojas y cabezas de flores, donde pueden constituir hasta el 5% del peso seco, son raras en los órganos subterráneos (Picman, 1986; Pérez-Ibañez, 2013).

Pueden clasificarse, en relación con su esqueleto carbocíclico (Figura 9), en los siguientes grupos: germacranólidos (anillo de diez miembros); eudesmanólidos y eremofilanólidos (todos los 6/6 compuestos bicíclicos); y guaianólidos, pseudoguaianólidos e hipocretenólidos (todos los 5/7 compuestos bicíclicos). Curiosamente, los guaianólidos y los pseudoguaianólidos comparten esqueletos similares, que se diferencian simplemente por la posición de un grupo metilo, que está en C-4 en guaianólidos y en C-5 en pseudoguaianólidos (Ghantous *et al.*, 2010).

En general, se acepta que los germacranólidos representan biogenéticamente la clase más primitiva de lactonas sesquiterpénicas y que todas las demás evolucionaron a partir de ellas (Picman, 1986). Una característica común e importante de estos compuestos es que contienen como estructura principal una gamma-lactona alfa-beta insaturada, o una alfa-metilen-gamma lactona, las cuales han mostrado estar asociadas con sus actividades biológicas, que despliegan (Díaz-Flores *et al.*, 1995).

Algunas lactonas sesquiterpénicas están en forma glicosídica y otras contienen halógenos o azufre (Picman, 1986).

El interés en estas moléculas se justifica por el amplio espectro de actividades biológicas que presentan, como son: antibacterial, antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antimalaria y actividad neurotóxica (Enriz *et al.*, 1998), además antineoplásica y citotóxica, ambas vinculadas a la función del agrupamiento α -metilén- γ -lactona. La actividad que presenta cada lactona sesquiterpénica se debe a las diferencias en el número de alquilaciones, lipofilicidad, geometría molecular de estos elementos y su entorno químico tomando como blanco los grupos tiol. Así, los grupos tiol de la cisteína parecen ser las dianas primarias de las lactonas sesquiterpénicas, la cual da lugar a la inhibición de diversas funciones celulares que conducen a las células a la apoptosis. En esencia, la interacción entre ellas y los grupos tiol de las proteínas dejan una reducción de la actividad enzimática o causan la interrupción del metabolismo, el cual es de vital importancia en el balance redox intracelular de la célula (Ruiz-Reyes y Suárez, 2015).

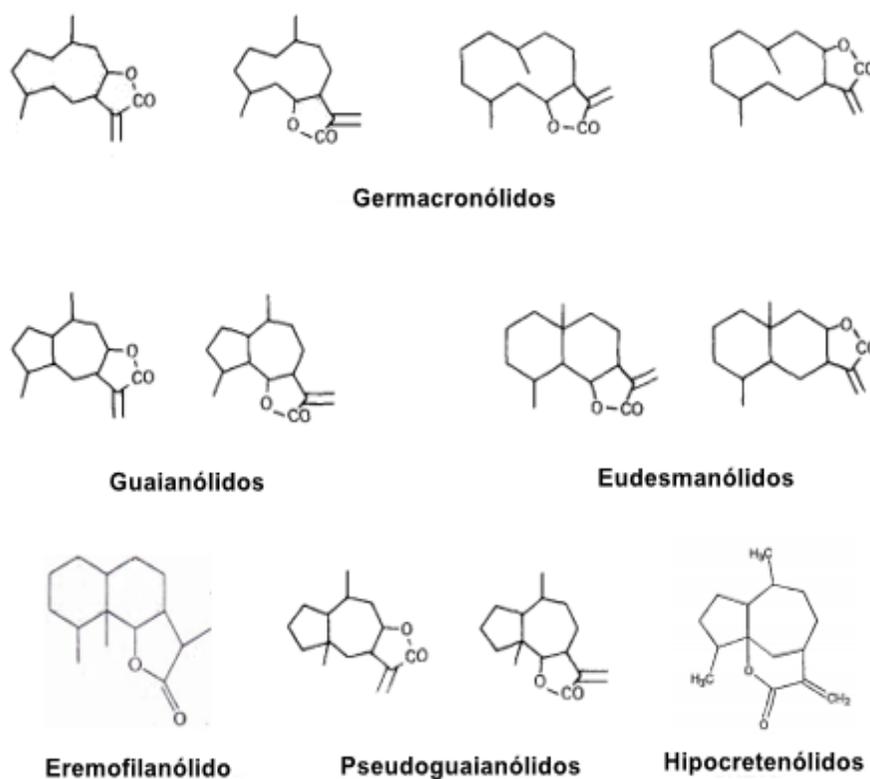


Figura 9. Clases de sesquiterpenlactonas (Apaza-Tacca y Gonzales-Uscamayta, 2015; Hidrobo-Guzmán, 2013; Picman, 1986).

Muestran actividad farmacológica interesante tales como: citotóxica, antitumoral, antiinflamatoria como la matricina de *Matricaria recutita* L., antipalúdica como la artemisinina aislada de *Artemisia annua* L., antimigrañosa, antimicrobiana y alergénica (Pérez-Ibañez, 2013).

2.2.2.2. Saponinas (triterpenos)

Muchas plantas sintetizan y acumulan saponinas (Figura 10) durante el crecimiento y desarrollo normales, su distribución varía mucho entre las especies de plantas, plantas individuales, órganos y tejidos, durante el desarrollo y la maduración, y muestra fluctuaciones estacionales, estas variaciones en la distribución de saponinas, la composición y las cantidades en las plantas pueden ser un reflejo de las diferentes necesidades de protección de las plantas (Moses *et al.*, 2014).

En varias especies de plantas, la producción de saponinas se induce en respuesta al estrés biótico como la humedad, la falta de nutrientes, la luz y la temperatura pueden influir en la calidad y la cantidad del contenido de saponinas (Szakiel *et al.*, 2011). Los cambios regulados por el estrés o el desarrollo en la composición de la saponina contribuyen a la acumulación total de metabolitos secundarios de la planta (Moses *et al.*, 2014).

Son un grupo complejo y químicamente variado de compuestos, estas se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroideos que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

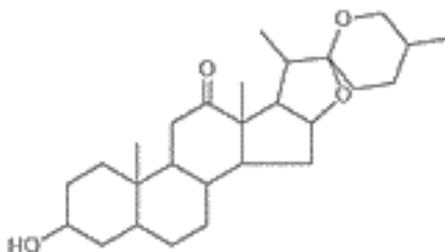


Figura 10. Estructura química de las saponinas (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

La amplia clasificación de los tipos de saponinas se basa en la naturaleza del esqueleto de aglicona, a partir del cual se derivan. Los esqueletos triterpenoides y esteroides de aglicona se derivan del precursor lineal de 30 carbonos (2,3-oxidosqualeno). La combinación de un esqueleto de aglicona hidrófobo y moléculas de azúcar hidrófilas hace que las saponinas sean altamente anfipáticas y les confiere propiedades espumantes y emulsionantes (Moses *et al.*, 2014).

Las saponinas son potentes agentes permeabilizantes de membrana, antimicrobianos, inmunoestimulantes, hipocolesterolémicos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antiprotozoarios, molusquicidas y tienen propiedades antioxidantes. En general, se considera que tienen funciones importantes en la defensa de las plantas contra plagas, herbívoros y patógenos (Moses *et al.*, 2014).

Algunas moléculas como las saponinas glucónidas, pueden inducir poros que cambian la permeabilidad de la membrana, lo que produce alteraciones en la homeostasis iónica entre los compartimentos intracelular y extracelular de las bacterias, también pueden interferir con el metabolismo energético a través de la interacción con las enzimas catabólicas y la cadena de transporte de electrones (Simões *et al.*, 2009); todo ello implica el mecanismo de la actividad inhibitoria en bacterias.

Algunos trabajos han evaluado la actividad antibacterial de ciertos triterpenoides de especies de helecho, como Niranjan-Reddy *et al.* (2001), aislaron el compuesto uno, 22,29 ξ -epoxy-30-norhopano-13b-ol y de otros seis compuestos conocidos como, fern-9(11)-en-6-ol, fern-9(11)-ene, fern-9(11)-en-25-oic acid, fern-9(11)-en-28-ol, filicenol-B, adiantona y producto de oxidación de fern-9(11)-en-6 α -ol obtenido como 6-oxofern-9(11)-ene de toda la planta de *Adiantum lunulatum*. Los compuestos fern-9(11)-ene, fern-9(11)-en-25-oic acid y adiantona fueron altamente activos contra *Salmonella* Typhi y moderadamente activos contra *P. aeruginosa*, mientras que el compuesto uno mostró actividad moderada contra *Salmonella* Typhi. Las bacterias Gram negativas, excepto *E. coli*, fueron altamente susceptibles a los compuestos fern-

9(11)-eno, fern-9(11) -en-25-oico y adiantona y fueron comparables con el control positivo de kanamicina.

2.2.3. Alcaloides

Son compuestos orgánicos que tienen un átomo de nitrógeno como parte de su estructura, generalmente están vinculadas a un sistema cíclico de cinco o seis carbonos (Harborne, 1999).

Los alcaloides tienen una distribución restringida en plantas superiores, encontrándose en aproximadamente el 20% de las especies de angiospermas, mientras que raramente en gimnospermas y helechos, y no se han registrado en musgos o hepáticas. Una razón de la distribución relativamente restringida de los alcaloides en los vegetales se debe a que el suministro de nitrógeno a la planta siempre es limitado, incluso en las leguminosas que fijan su propio nitrógeno (Harborne, 1999).

Todos los metabolitos nitrogenados se derivan de algunos de los aminoácidos de las proteínas, por lo que siempre hay competencia por estos precursores que también se requieren para procesos más básicos como la síntesis proteica. En los tejidos vegetativos la concentración es baja mientras que los niveles de alcaloides pueden ser significativamente más altos en los tejidos de almacenamiento (raíces, frutos, semillas) que en las hojas verdes (Harborne, 1999).

Los alcaloides tienen una ruta metabólica compleja que implica las rutas del mevalonato, ácido shikímico, ácido malónico y mezclas de las mismas (Martin-Gordo, 2018). Se sintetizan normalmente a partir de unos pocos aminoácidos comunes, en concreto lisina, tirosina y triptófano, sin embargo el esqueleto carbonado de algunos alcaloides contiene un componente derivado de la ruta de los terpenos (Taiz y Zeiger, 2006).

Estos metabolitos se han estructurado de acuerdo con su origen biogénico; con base en esta clasificación se tienen cuatro grupos: 1) alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano, y de los ácidos antranílico y nicotínico; 2) alcaloides purínicos; 3) terpenos

aminados y 4) alcaloides policétidos. Entre los alcaloides derivados del triptofano se encuentran los alcaloides indólicos, mismos que pueden ser reagrupados en monoterpenos o indol terpenos (iridioides). Dentro del grupo de los alcaloides indólicos existen numerosos subgrupos, los cuales dependen del modo en que se ciclan después de la remoción del residuo de glucosa de la estrictosidina (Loyola-Vargas *et al.*, 2004).

Se ha investigado el mecanismo de acción antibacteriano de los alcaloides cuaternarios planos altamente aromáticos, la cual, se atribuye a su capacidad de intercalación con el ADN (Cowan, 1999), en la clase de indolizidina, se ha propuesto que los alcaloides pergularinina y la tiloforinidina actúan inhibiendo la síntesis de ácido nucleico, ya que inhiben la enzima dihidrofolato reductasa; para la clase isoquinolina, se han propuesto dos mecanismos: las isoquinolinas benzofenantridina y protoberberina que actúan perturbando el anillo Z e inhibiendo la división celular, y la sanguinarina y la berberina que se unen a la proteína FtsZ, inhiben la actividad de la FTSZ GTPasa, inhiben la formación del anillo Z e inducen el alargamiento de las células sin afectar la replicación del ADN, la segregación de los nucleósidos o la estructura de la membrana (Tim-Cushnie *et al.*, 2014).

La fenantridina isoquinolina ungeremina actúa inhibiendo la síntesis de ácido nucleico después de la inhibición de las topoisomerasas de tipo I. La poliamina alcaloide escualamina se piensa que actúa comprometiendo la membrana externa y la integridad de la membrana citoplasmática. La escualamina, penetra en las monocapas de lipopolisacáridos reconstituidas, causa la despolarización de la membrana citoplásmica, aumenta la tinción bacteriana con el yoduro de propidio del ácido nucleico resistente a las células y causa la fuga de contenidos citoplásmicos (Tim-Cushnie *et al.*, 2014). Lo anterior señala que tal parece que los alcaloides tienen efectos muy variados sobre las bacterias, lo que posiblemente señale mecanismos diferenciados acorde a la estructura química.

2.3. BACTERIAS EMPLEADAS EN LOS ENSAYOS

Al dominio Bacteria corresponden las células procariotas, una de cuyas características es la de carecer de membrana nuclear. Su importancia radica en el hecho de haber desarrollado una pared celular o membrana externa que les confirió, desde el principio, autonomía y protección con respecto a su medio ambiente. Desde entonces constituyeron la forma de vida más abundante en el planeta en términos de biomasa y número de especies. Las bacterias pueden vivir en hábitats extremos, se les encuentra en las profundidades de la Tierra, sobreviviendo gracias al lento catabolismo del carbono orgánico depositado en los sedimentos, y en las profundas fuentes hidrotermales submarinas (Molina y Uribarren, 2017).

Las bacterias son agentes etiológicos de numerosas enfermedades, al inicio del siglo XX las enfermedades infecciosas eran una de las causas de muerte más frecuentes y, aunque se ha conseguido controlar a muchas de ellas con la consiguiente disminución de la mortalidad, pero aún hoy constituyen una de las principales causas de muerte en países subdesarrollados (Lizarbe-Iracheta, 2009). Sin embargo, también existen infecciones bacterianas que aunque están asociadas en menor frecuencia como causa de muerte, son un problema de salud pública (Molina y Uribarren, 2017).

Cabe resaltar que, aunque ciertos microorganismos son los agentes responsables de algunas enfermedades, la mayor parte de ellos no son perjudiciales para el hombre (Lizarbe-Iracheta, 2009). Se estima que el intestino de un ser humano adulto alberga entre 500 y 1 000 diferentes especies bacterianas. La mayoría de esos microorganismos pertenecen al dominio Bacteria, que incluye tanto a bacterias Gram negativas como Gram positivas (Molina y Uribarren, 2017), clasificados de esta manera de acuerdo al bacteriólogo Hans Christian Joachim Gramen quien desarrolló una técnica de coloración diferencial para la observación de bacterias, y la denominó Tinción Gram (Mollinedo-Patzi y Gonzales-Villalobos, 2014). Las bacterias teñidas de azul-violeta se denominaron Gram positivas, y las teñidas de rojo como Gram negativas (Rodríguez y Arenas, 2018).

Los fundamentos de diferenciación de las bacterias está en la estructura de la pared celular, ya que las bacterias Gram negativas tienen una pared celular delgada,

y está unida mediante lipoproteínas a otra membrana plasmática externa, dicha membrana es soluble en solventes orgánicos y la capa de péptidoglucano es muy delgada y no retiene el complejo de cristal violeta, y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea (Mollinedo-Patzi y Gonzales-Villalobos, 2014).

2.3.1. Bacterias Gram positivas

La pared de las bacterias Gram positivas está formada por una capa de péptidoglucano separada de la membrana plasmática por el espacio periplásmico. El constituyente básico de la pared celular es el péptidoglucano, éste está formado por un esqueleto de glicano en el que se alternan dos tipos de hidratos de carbono la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, que a su vez se une con cinco aminoácidos (tetrapéptido) y a su vez se conecta con otro tetrapéptido, generando una estructura en forma de jaula (Lizarbe-Iracheta, 2009).

También la pared celular bacteriana contiene ácidos teicoicos (polímeros de glicerol y ribitol unidos por grupos fosfato) que se unen covalentemente al hidroxilo de la posición 6 del ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de membrana, denominándose en este último caso ácido lipoteicoico. Este tipo de enlace genera entrecruzamientos covalentes entre las cadenas de glicanos, proporcionando una estructura compacta y estable (Lizarbe-Iracheta, 2009) (Figura 11).

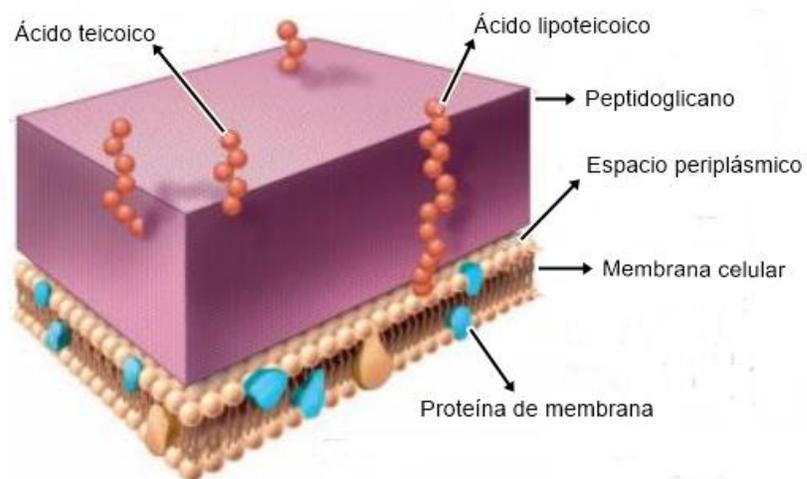


Figura 11. Envoltura celular de bacterias Gram positivas (Modificado de Cowan, 2012).

El grosor de la capa de peptidoglicano suele ser muy superior al de las bacterias Gram-negativas (Lizarbe-Iracheta, 2009). Entre los géneros que causan infecciones en el hombre están: *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*, los que incluyen especies que en la actualidad han desarrollado resistencia a antimicrobianos (Morfín-Otero *et al.*, 2002).

2.3.1.1. Género *Staphylococcus*

Existen más de 30 especies de estafilococos pertenecientes a la familia *Staphylococcaceae*; el término *Staphylococcus* viene de la palabra griega Staphyle que significa racimo de uvas y coccus que significa grano, haciendo referencia a la agrupación que adquieren las bacterias cuando se observan a través de un microscopio (Baos-Muños, 2017).

Las bacterias de este género son de forma esférica, de aproximadamente 0.5 a 1.5 μm de diámetro. Son bacterias inmóviles, no forman esporas, generalmente no poseen cápsula o la formación de esta es limitada y, raras excepciones son anaerobias facultativas (Llop *et al.*, 2001; De Cueto y Pascual, 2009), son catalasa positivo (Baos-Muños, 2017). Por lo general se encuentran como parte de la flora normal de la piel y mucosas (Rodríguez *et al.*, 2005), predominando en las fosas nasales, nasofaringe y en algunos casos el tracto urogenital (García-Martos *et al.*, 1997). En su relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos (Llop *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus

Esta bacteria fue denominada en 1984 por Rosenbach debido al pigmento amarillo-dorado de sus colonias. Su principal reservorio lo constituyen las fosas nasales anteriores, representando así un factor de riesgo muy importante de infecciones nosocomiales (Sejas-Claro *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus tiene un diámetro aproximado de 0.8 a 1.2 μm (Ramírez-Cuenca, 2005), es coagulasa positivo, crece formando colonias lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, de consistencia cremosa, con una coloración amarillenta a dorada debido a la producción de un pigmento carotenoide. Algunas cepas están recubiertas por una capa de polisacáridos externos denominada slime o

cápsula mucoide, que confiere, en ciertas condiciones, una mayor capacidad de adherencia (De Cueto y Pascual, 2009). La pared celular de la bacteria está constituida por peptidoglicano, cuyas cadenas laterales de aminoácidos se unen mediante puentes pentapeptídicos (que en *S. aureus* son de pentaglicina) y ácidos teicoicos (ribitol en *S. aureus* y glicerol en *S. epidermidis*), los cuales han sido propuestos como componentes importantes de la pared celular para la adherencia (Cisterna-Cáncer y Madariaga-Torres, 1986).

Es una bacteria considerada como oportunista, debido a que ocasiona enfermedades al humano, principalmente cuando éste atraviesa lapsos de vulnerabilidad que disminuyen la competencia de su sistema inmunológico, y bajo las condiciones óptimas es capaz de provocar afecciones en casi cualquier región anatómica, lo cual refleja su conjunto de genes de virulencia que lo capacitan para establecerse, reproducirse, sobrevivir y diseminarse en diversas clases de tejidos (Gordon y Lowy, 2008).

El mecanismo de transmisión más importante de esta bacteria es por contacto directo (Sejas-Claro *et al.*, 2016). Produce toxinas, tales como citotoxinas (α , β , δ y Υ leucocidina de PV), toxina exfoliativa (ETA y ETB), enterotoxinas (A-E, G-I) y toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1 (Zendejas-Manzo *et al.*, 2014), además son causantes del síndrome de la piel escaldada y el síndrome del shock tóxico (Sejas-Claro *et al.*, 2016).

Es agente causal frecuente de infecciones leves localizadas en piel y tejido subcutáneo, e intoxicaciones alimentarias en humanos (Gaona-Hernández, 2016). También causa enfermedades sistémicas como, endocarditis, neumonía, artritis séptica, osteomielitis, bacteriemias (Sejas-Claro *et al.*, 2016), úlceras crónicas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda (Marquilles-Bonet *et al.*, 2015) pudiendo entablar una relación de huésped-portador asintomático (Gaona-Hernández, 2016).

Staphylococcus aureus destaca como uno de los principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias a nivel mundial. Éstas, como muchas otras bacterias, producen altas concentraciones de β -lactamasas, que inactivan a la mayor parte de

los antibióticos clasificados como β -lactámicos, sin embargo, también resultan resistentes a antibióticos clasificados como penicilinas (Gordon, 2008).

Una vez que ha iniciado un cuadro estafilocócico, la evolución del proceso infeccioso es incierta, debido a la influencia de numerosas toxinas, enzimas y componentes estructurales de la bacteria, así como de ciertos elementos predisponentes. De igual forma muchos de los genes asociados a la virulencia de *S. aureus* son regulados por un efectivo sistema de *quorum-sensing*, que coordina su comportamiento durante la colonización de los tejidos humanos y la aplicación de estrategias para su sobrevivencia (Garza-Velasco *et al.*, 2013).

Como ya se anotó, esta bacteria tiene una compleja variedad de antígenos celulares y extracelulares; así mismo, algunas cepas son capaces de adquirir genes que las capacitan para producir ciertas toxinas y enzimas (enterotoxinas, penicilinasas) que le otorgan mayor patogenicidad (Gaona-Hernández, 2016).

Staphylococcus epidermidis

Al igual que *S. aureus*, las bacterias de esta especie son de forma esférica, y se agrupan de forma irregular. En agar sangre produce colonias color blanco, no hemolítico y pueden medir de 1 a 2 μm de diámetro. Es negativo para manitol, B-galactosidasa, coagulasa, y positiva para fosfatasa (Acero-Montaña y Marcela-Vargas, 2008), catalasa y ureasa; es anaerobia facultativa que puede crecer mediante la respiración aeróbica o por fermentación de hidratos de carbono como la glucosa y sacarosa (López-Edgar, 2013).

Es capaz de establecer una relación comensal de por vida con los seres humanos, encontrándose por primera vez en el útero, como lo demuestra su presencia en el líquido amniótico. La piel del recién nacido será colonizada en unos pocos días y a partir de entonces se convierte en parte de la microbiota “normal” residente de la piel humana. Para persistir en la piel humana *S. epidermidis* ha desarrollado diversos mecanismos para detectar y superar las características físicas y químicas de la defensa antimicrobiana del huésped. Tales mecanismos incluyen adhesinas de superficie que permiten la unión al huésped, sistemas para detectar péptidos

antimicrobianos (AMP) y moléculas de comunicación, mecanismos contra AMP y estrategias de supervivencia contra la desecación y el estrés osmótico (Sabaté-Brescó *et al.*, 2017).

Para que *S. epidermidis* cambie de un habitante normal de la piel humana a un agente infeccioso requiere de un huésped predispuesto y por lo tanto, claramente debe ser descrito como oportunista. En general, el éxito de esta bacteria como patógeno se atribuye a su capacidad para adherirse a las superficies y permanecer allí, bajo la cubierta de un material extracelular protector (Vuong y Otto, 2002).

Es por ello que ahora se le reconoce como un patógeno importante y es considerado el agente causal de diferentes entidades clínicas, entre las que destacan, infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa y bacteriemia en pacientes inmunosuprimidos (García-Apac *et al.*, 2003).

Las toxinas son los contribuyentes más importantes de la virulencia agresiva, en *S. epidermidis* se limita principalmente a las modulinas anfipáticas solubles en fenol (PSM), estos son péptidos α , helicoidales, anfipáticos, característicamente cortos y tienen funciones proinflamatorias, y a veces citolíticas (Otto, 2009), igualmente varias enzimas degradativas secretadas, en su mayoría proteasas, se unen a la virulencia (Otto, 2014).

Muchas cepas tienen la capacidad de formar un biofilm o biopelícula, basada en ácido teicoico, el cual forma normalmente parte de la pared celular de estafilococo (Breña *et al.*, 2009). La cápsula del organismo, conocida como polisacárido de adhesión intercelular (PIA), se compone de polisacárido sulfatado, esto permite que otras se unan a la biopelícula ya existente, creando una biopelícula multicapa, disminuyendo así la actividad metabólica de las bacterias dentro de ellas (López-Edgar, 2013). Esta capa los protege de la acción de los neutrófilos y a su vez disminuye la penetración de los antibióticos y los mecanismos de defensa del hospedador (Breña *et al.*, 2009).

2.3.1.2. Género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, en la que principalmente se encuentran microorganismos esféricos o bacilares esporulados, la mayoría claramente Gram-positivos, dotados o no de cápsula, móviles o inmóviles y aerobios, anaerobios facultativos o anaerobios, se distinguen cinco géneros, *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* (Ruiz-López y Pinzón-López, 2009). Las bacterias pertenecientes a esta familia se caracterizan porque todas forman esporas en su proceso metabólico (Bustillo, 1979).

Las especies de este género tienen un tamaño que varía de 0.5 a 2.5 μm (Winn *et al.*, 2008), son móviles por la presencia de flagelos laterales (Cuervo, 2010). Las colonias de *Bacillus* son de forma irregular y color crema, la apariencia de los bordes de las colonias varía entre aserrada, lobulada, digitiforme y ondulada; las elevaciones de las colonias suelen ser planas o acuminadas, en este último caso presentan el centro más elevado en forma de anillo, la consistencia suele ser seca pero también se presentan colonias cremosas y ligosas. La gran mayoría presenta una superficie opaca, las colonias de *Bacillus* presentan la característica de formar un anillo concéntrico y borde irregular en el centro (Calvo y Zúñiga, 2010).

Se encuentra ampliamente distribuido en los más diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y el suelo, y sus especies están muchas veces asociadas a plantas (Calvo y Zúñiga, 2010; Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Los miembros de este género se caracterizan por ser Gram-positivos, de forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y formadores de endosporas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Este género de bacterias tienen la ventaja de poseer diversos mecanismos para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, bajo estas condiciones *Bacillus* spp. inicia una serie de respuestas para poder mantenerse en estado vegetativo si estas respuestas fallan, se induce la esporulación. La habilidad de las especies de *Bacillus* de formar endosporas altamente resistentes les da una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo (Calvo y Zúñiga, 2010).

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis es una bacteria metabólicamente versátil, capaz de adaptarse eficientemente a una amplia variedad de condiciones de estrés, como estrés por calor o privación de fosfato (Hahne *et al.*, 2010), puede crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55 °C), presenta motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevive en concentraciones salinas hasta del 7% de NaCl, produce una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares. Es una de las 40 especies reconocidas del género *Bacillus*, su identificación es sencilla: forma esporas termoresistentes, es catalasa y Voges-Proskauer positivo y la hidrólisis del almidón es positiva (Monteros-Fernández, 2005).

Esta bacteria puede expresar al menos cinco tipos de células distintas (subpoblaciones), que a menudo se estudian en el contexto de la formación de biopelículas. Cada uno de estos tipos de células está asociado con un conjunto único de fenotipos: motilidad, producción de surfactina, producción de matriz, producción de proteasas y esporulación (Gestel *et al.*, 2015).

2.3.2. Bacterias Gram negativas

Este tipo de microorganismos tiene una envoltura celular que se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna o citoplasmática consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010), la cadena peptídica está constituida por un aminoácido proteico (L-Ala) y aminoácidos no proteicos (D-Ala, D-Gli y ácido meso-diaminopimélico). Las cadenas de glicano se unen estableciendo enlaces covalentes a través de las cadenas de aminoácidos. De igual forma poseen una proteína de membrana, la lipoproteína de Braun, que está unida covalentemente al péptidoglucano y se incluye en la membrana externa (Lizarbe-Iracheta, 2009).

La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) en la parte más externa, son un importante factor de

virulencia de estas bacteria, lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas que facilitan el paso de diversas sustancias (incluidos los antibióticos betalactámicos), y otras proteínas de la membrana externa (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010) (Figura 12).

La estructura resultante de la pared de las bacterias Gram-negativas puede funcionar como barrera protectora, reduciendo la permeabilidad a moléculas tóxicas y a antibióticos y por tanto, disminuyendo su eficacia terapéutica (Lizarbe-Iracheta, 2009).

Muchas bacterias de este tipo poseen estructuras complejas que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido (Lizarbe-Iracheta, 2009).

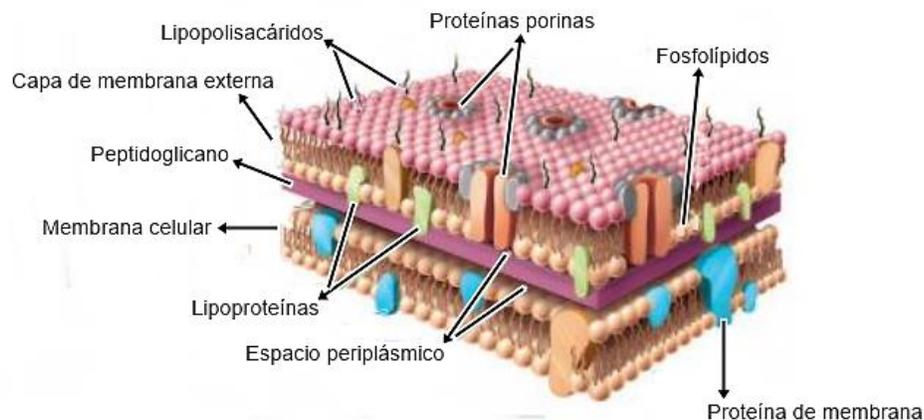


Figura 12. Envoltura celular de bacterias Gram negativas (Modificado de Cowan, 2012).

Entre las familias que integran este grupo de microorganismos está la *Enterobacteriaceae* que constituye uno de los grupos más grande y heterogéneo de bacterias Gram-negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos 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.

Escherichia coli, el microorganismo más prevalente de esta familia, es una de las bacterias prototípicas sometidas a estudio, y géneros como *Salmonella* y *Shigella*, entre otros, presentan una importancia clínica (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

2.3.2.1. Género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son anaerobios facultativos; crecen bien en los medios de cultivo habituales, se han agrupado en las especies *S. enterica* y *S. bongori*. Los serotipos causantes de enfermedad en animales de sangre caliente pertenecen a la sub-especie *enterica*, y comparten más de 90% de su ADN. Sin embargo, tienen diferencias importantes tales como el rango de hospederos a los cuales infectan y los síntomas clínicos de la enfermedad que producen (Barreto *et al.*, 2016).

Salmonella son bacilos Gram negativos, su tamaño varía de 0.7 a 1.5 μm de ancho y 2 a 5 μm de largo (Ellermeier y Slauch, 2006), aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados (Montalvo-Merino y Bravo-Delgado, s.f.), no capsuladas (salvo *Salmonella* serotipos Typhi, Paratyphi O y Dublin), normalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *Salmonella* serotipo Gallinarum), crecen bien en medios ordinarios entre límites de pH 6-8, forman colonias circulares, planas, convexas y brillantes (Alonso-Melero, 1994). Producen sulfuro de hidrógeno (H_2S), fermentan glucosa, pero no lactosa, no producen ureasa (Melara-Cruz y Salazar-Artiga, 2012), son catalasa positivo y oxidasa negativa (Ramírez-Cuenca, 2005).

Las bacterias *Salmonella* spp. viven en el tracto intestinal de animales sanos, principalmente, aves de corral, ganado vacuno y porcino, y animales domésticos (tortugas, perros, gatos, roedores) sin provocar problemas de salud. En el medio ambiente (heces), esta bacteria sobrevive durante mucho tiempo debido a su gran resistencia a la baja actividad de agua (Elika, 2013).

Salmonella se transmite por la ruta fecal-oral, ya sea directamente, o bien indirectamente, a través de los alimentos (Barreto *et al.*, 2016). Puede permanecer viable en productos ricos en proteínas y grasas. Si los alimentos no se refrigeran

rápidamente (el límite de crecimiento está en 6°C) el microorganismo se multiplica, con el consiguiente riesgo de contaminar los alimentos. Cuando las bacterias *Salmonella* pasan de los animales hospedadores a los alimentos derivados (carne, huevos, leche) es capaz de multiplicarse a una velocidad muy elevada, ya que puede duplicar su número cada 15 ó 20 minutos si la temperatura ambiente supera los 30°C, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C. Por tanto, temperatura y tiempo son dos factores claves en el desarrollo de *Salmonella* (Elika, 2013).

***Salmonella* Typhi**

Salmonella enterica serotipo Typhi (*Salmonella* Typhi) es un bioserotipo de salmonela adaptado estrictamente al hombre, que causa la fiebre tifoidea. Aunque esta infección ha disminuido en los países desarrollados, es muy frecuente en los países con bajo nivel sanitario (Barreto *et al.*, 2016; González-López *et al.*, 2007).

Es así como *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. enteritidis*) y *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) poseen un amplio rango de hospederos y la mayoría de las veces generan una enfermedad gastrointestinal en el ser humano, infección sistémica en el ratón y un cuadro crónico asintomático en aves (Jurado-Jiménez *et al.*, 2010).

De acuerdo con la presencia de los antígenos O (lipopolisacárido), Vi (polisacárido capsular) y H (flagelar) pueden actualmente serotiparse (Jurado-Jiménez *et al.*, 2010). Sin embargo, el potencial patogénico está representado por *S. enterica* y por sus más de 2 600 serotipos descritos hasta la fecha (Barreto *et al.*, 2016).

De las enfermedades transmitidas por alimentos, la salmonelosis es una de las más comunes y está ampliamente distribuida en el mundo; se le considera un problema de salud pública principalmente en los países en desarrollo, en donde las condiciones de saneamiento básico y de educación sanitaria y ambiental son precarias o inexistentes (Oliveira-Souza *et al.*, 2010), generalmente contraída por el consumo de alimentos de origen animal, principalmente carne, pollo, huevos y leche, y también por vegetales contaminados con materia fecal (Díaz-Osorio *et al.*, 2014).

Salmonella es capaz de sobrevivir la acidez del estómago y la alta osmolaridad del intestino delgado, induce su internalización por las células epiteliales intestinales del íleon y resiste la fagocitosis mediada por las células dendríticas y macrófagos, logrando colonizar el tejido linfóide subyacente y los ganglios linfáticos mesentéricos (Barreto *et al.*, 2016).

Los macrófagos se consideran las células blanco de la infección, ya que la bacteria se establece en un compartimiento ácido conocido como la vacuola que contiene a *Salmonella*, donde es capaz de evadir la actividad lítica de los componentes lisosomales, multiplicarse y propagarse en el tejido intestinal o en el resto del organismo de su hospedero cuando se establece una infección local o sistémica, respectivamente (Barreto *et al.*, 2016).

Una vez que la persona ingiere salmonellas el desarrollo de la enfermedad va a depender fundamentalmente de la cantidad de microorganismos ingeridos (inóculo), de su virulencia y de factores dependientes del huésped. El periodo de incubación suele ser variable, entre dos y tres semanas (Jurado-Jiménez *et al.*, 2010).

Dependiendo del tamaño del inóculo, los factores de virulencia y el estado inmunológico del paciente, puede ocasionar desde una infección gastrointestinal leve y autolimitada hasta una enfermedad sistémica que llega a poner en peligro la vida del paciente, afectando a personas de cualquier edad y condición social y que constituye una de las causas más comunes de gastroenteritis en los grupos más vulnerables, los niños y los ancianos, en los que puede ocasionar la muerte (Díaz- Osorio *et al.*, 2014).

Salmonella enterica serovar Typhi, cuando produce enfermedad, esta se caracteriza por la fiebre prolongada, cefalea, mialgia, artralgia, anorexia, malestar general, alteraciones del tránsito intestinal (diarrea o constipación) y hepato y/o esplenomegalia. Si no se trata, la enfermedad puede evolucionar por semanas o hasta meses, resultando en complicaciones como perforación intestinal, hemorragia y confusión mental progresiva, pudiendo llevar a óbito (Oliveira-Souza *et al.*, 2010).

El cloranfenicol está considerado como el medicamento de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea. Sin embargo, diversas publicaciones han informado

acerca de la resistencia de muestras de *Salmonella* Typhi a altas concentraciones de cloranfenicol en diversos países de Asia y África, en proporciones elevadas, como en India (20%) y en Nigeria (25%) (Oliveira-Souza *et al.*, 2010).

Uno de los factores que favorecen la persistencia de *Salmonella* en variados ambientes es su capacidad de formar biopelículas sobre diferentes tipos de superficies, inertes y vivas. Esta habilidad contribuye a su supervivencia tanto en ambientes hostiles como también en condiciones favorables para su desarrollo. Las biopelículas pueden formarse sobre una gran variedad de superficies (plástico, vidrio, gomas, acero inoxidable, etc.) y son los biopolímeros extracelulares los responsables de la adhesión de las células a las mismas (Barreto *et al.*, 2016).

Salmonella es considerada una bacteria que se transmite frecuentemente a la población humana desde los animales y por lo tanto, tiene el riesgo asociado de transferir determinantes de resistencia que se han seleccionado a través de las mencionadas malas prácticas veterinarias. Otro factor que puede explicar estos hallazgos, es la presencia de los denominados plasmidios de virulencia-resistencia en *Salmonella*, que codifican, tanto factores de resistencia antimicrobiana como factores de virulencia y pueden existir procesos de co-selección de estos determinantes, incluso en ausencia de antimicrobianos (Barreto *et al.*, 2016).

2.3.2.2. Género *Shigella*

El género *Shigella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*; los serogrupos de *Shigella* están divididos en *flexneri*, *sonnei*, *boydii* y *dysenteriae*, siendo *Shigella sonnei* la especie endémica más prevalente en países desarrollados (Bridle, 2013; Guevara *et al.*, 2014).

Está constituido por bacilos cortos Gram-negativos sin agrupación, que miden de 0.7 μm por 3 μm ; son inmóviles, no esporulan, ni presentan cápsula (León-Ramírez, 2002; Percival y Williams, 2014). Las shigellas son organismos anaeróbicos facultativos que crecen pobremente en condiciones anaeróbicas. La temperatura óptima para el crecimiento de *Shigella* es de 37°C, son capaces de tolerar condiciones extremadamente ácidas con pH de 2.5, por períodos cortos, prefieren crecer a un pH

neutro o ligeramente alcalino con pH de 7.0–7.4 (Percival y Williams, 2014). Son oxidasa negativos y fermentadores de la glucosa (León-Ramírez, 2002).

Shigella sonnei

Shigella es una bacteria altamente enteroinvasiva; su hábitat es el colon y el humano es el principal reservorio. Se transmite a través de contacto directo o indirecto (alimentos y líquidos contaminados, principalmente) con heces de personas infectadas (Molina y Uribarren, 2015).

Los dos principales factores de virulencia de *Shigella* son sus técnicas invasivas y propiedades toxigénicas, sin embargo, el papel exacto de la toxina producida por *Shigella* aún no se ha definido (Percival y Williams, 2014). Su amplia resistencia a antibióticos está dada por la presencia de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) y genes que codifican pili de tipo IV (Chung *et al.*, 2015; Manera *et al.*, 2017).

Las especies de *Shigella* son reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema mayor de salud pública. Es una de las principales causas de diarrea en pacientes pediátricos en países en desarrollo, mientras que en países desarrollados es causa de diarrea ocasional en niños. Como la mayoría de infecciones gastrointestinales, la shigelosis está asociada con deficiencias en salud ambiental y en la higiene personal (Bridle, 2013; Guevara *et al.*, 2014).

Actualmente, existe un problema creciente universal respecto al aumento de resistencia antibacteriana de *Shigella* spp. La rápida emergencia de cepas multi-resistentes se debe en gran parte a su habilidad de adquirir y diseminar genes exógenos asociados con elementos genéticos móviles tales como plásmidos, transposones, integrones e islas genómicas (Marcoleta *et al.*, 2013).

2.3.2.3. Género *Escherichia*

Bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* descrita por primera vez por Theodor Escherich en 1885; es considerada la primera causa de diarrea bacteriana. Dicha bacteria coloniza el intestino del ser humano al momento del nacimiento, pueden transmitirse directamente de persona a persona, de animal a persona o indirectamente a través del agua o los alimentos contaminados (Ochoa *et al.*, 2011).

Las especies de este género son bacilos cortos, no esporulados, con fimbrias y flagelos peritricos (Molina, 2010). En medios de cultivo sólidos las colonias crecen de forma circular, lisas, de bordes continuos; algunas cepas producen colonias mucoides (Tay-Zavala, 2012).

Escherichia coli

E. coli es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio facultativo, oxidasa negativo, reductor de nitritos, no esporulados, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas (Fernández-Ferrán *et al.*, 2003). Es un bacilo que puede medir entre 1.1 a 1.5 µm de diámetro por 2 a 6 µm de largo, disponiéndose aislados o en parejas (Faleiro-Naves, 2010; Rípodas *et al.*, 2017), puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7°C y 50°C, con una temperatura óptima de 37°C, algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4.4 (OMS, 2018).

La mayoría de las *E. coli* son comensales normales que se encuentran en el tracto digestivo (Oliveros, 2013). Presenta tres antígenos: O, somático (grupo); H, flagelar (tipo) y K, de superficie (asociado al grupo) (Fernández-Ferrán *et al.*, 2003). Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* que se han convertido en patógenas por la adquisición de factores de virulencia a través de plásmidos, transposones, bacteriófagos o islas de patogenicidad. Estas *E. coli* patógenas pueden ser categorizadas de acuerdo a serogrupos, mecanismos patogenicidad, síntomas clínicos, o factores de virulencia (Oliveros, 2013). El mecanismo patogénico que ocasiona la diarrea es variable, y está en dependencia del grupo o categoría de *E. coli* que infecte al individuo, por lo que puede existir: invasividad, adherencia a la superficie de la mucosa, producción de enterotoxinas y producción de citotoxinas (Fernández-Ferrán *et al.*, 2003).

Los seis diferentes patotipos de *E. coli* diarrogénicas (DEC), son: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), que causa la diarrea del viajero y la diarrea del destete; *E. coli* enteropatógena (EPEC), produce diarrea aguda principalmente en niños; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC ó STEC), capaz de causar colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), puede ocasionar brotes de diarrea con sangre; *E. coli* enteroagregativa (EA_ggEC), causa diarrea persistente en niños y

E. coli de adherencia difusa (DAEC), que causa diarrea acuosa en niños (Rivero *et al.*, 2004; Ávila-Cortés *et al.*, 2011; Ochoa *et al.*, 2011).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC o ECEP)**

Es un tipo importante dentro de las cepas diarreogénicas de *E. coli* y se asocia a diarrea infantil, aguda o persistente, principalmente en países en vías de desarrollo. Fue descrito por primera vez en los EE. UU. en 1945 por Bray, quien refirió la asociación de cepas de *Escherichia* antigénicamente homogéneas con brotes de diarrea infantil (diarrea de verano) en Inglaterra. A partir del Segundo Simposio Internacional sobre EPEC realizado en San Pablo, Brasil en 1995, se aceptó la definición de que las “EPEC son cepas diarreogénicas de *E. coli* que producen en las células intestinales lesiones histopatológicas de tipo A/E adherencia y borrado o esfacelamiento (“adhesion and erase”) y que no producen toxinas tipo Shiga (Varela *et al.*, 2007).

De manera distintiva, todas las cepas de EPEC contienen una isla de patogenicidad denominada LEE en el cromosoma bacteriano (como ECEH), mientras que sólo los aislamientos más virulentos codifican al plásmido EAF. Las cepas típicas presentan el patrón de adherencia localizada (LA, *localized adherence*) sobre cultivos de células epiteliales, mientras que las cepas atípicas poseen adherencia semejante a la localizada (LAL), adherencia difusa o, en algunos casos, adherencia agregativa (Vidal *et al.*, 2007).

Actualmente, el patotipo EPEC se divide en EPEC típico (tEPEC) y EPEC atípico (aEPEC), basado en la presencia del factor de virulencia, asociado a la adherencia y codificado en el plásmido denominado *E. coli*-adherence-factor (EAF), presente en tEPEC y ausente en aEPEC. Ambos grupos producen una lesión característica en las células intestinales conocida como A/E de adherencia y borrado de las micro vellosidades, que resulta de la acción cooperativa de proteínas codificadas en un isla de patogenicidad denominada *locus of enterocyte effacement* (locus LEE) (Silveyra *et al.*, 2015).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC O ECEH)**

Se define como un patotipo que produce toxina Shiga (Stxs o Stx el factor clave de virulencia, también conocida como verotoxina (The Center for Food Security and Public Health [CFSPH], 2010). La toxina se libera a través de la lisis mediada por fagos lambdoides en respuesta al daño en el ADN y la respuesta SOS por lo que el uso de antibióticos está contraindicado pues induciría la liberación de la toxina que tiene como blanco el ARNr 23s, para cesar la síntesis de proteínas eucariotas, lo que conduce a la muerte celular (Oliveros, 2013), y que además posee la isla de patogenicidad LEE (CFSPH, 2010) (locus de destrucción del enterocito y en inglés, locus of enterocyte effacement) que codifica para un sistema de secreción tipo III y proteínas efectoras. *E. coli* O157:H7 es el serotipo más frecuente de ECEH aislado de personas enfermas en Norteamérica, Europa y Japón (Oliveros, 2013).

La toxina Stx es producida en el colon y viaja vía sanguínea al riñón, donde daña las células endoteliales renales y ocluye la microvasculatura a través de una combinación de toxicidad directa y la inducción de citosina local y producción de quimiocinas, resultando en una inflamación renal (Oliveros, 2013); induce apoptosis de células epiteliales intestinales, además media daño local en el colon, que resulta en diarrea hemorrágica, colitis hemorrágica, necrosis y perforación intestinal. En ocasiones, la colitis hemorrágica deriva en síndrome urémico hemolítico (SUH), una causa importante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos (CFSPH, 2010).

Los humanos adquieren la ECEH por contacto directo con los portadores animales, sus heces (vía fecal-oral) y el suelo o agua contaminados, o a través de la ingestión de carne molida mal cocida, otros productos derivados de animales o vegetales y frutas contaminadas. Las aves y las moscas son vectores potenciales. La dosis infectiva es muy baja, lo cual incrementa el riesgo de contraer la enfermedad (CFSPH, 2010).

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC o ECET)**

Es el agente asociado con mayor frecuencia a diarrea infantil en el mundo y con mayores tasas de mortalidad y morbilidad en niños menores de 5 años después de rotavirus. Además, se le reconoce como el agente más frecuentemente asociado a la diarrea del viajero (Gómez-Duarte, 2014). En México, esta bacteria se ha aislado hasta en un 70% de los casos y su desarrollo se relaciona con zonas donde la higiene es precaria (Chávez-Bravo *et al.*, 2007).

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas antígenos del factor de colonización (CFA) (en inglés, colonization factor antigens). Su patogenicidad involucra factores de colonización, expresión de adhesinas intestinales, siendo su principal mecanismo la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) que contienen múltiples residuos de cisteína que le confiere estabilidad (Rodríguez-Angeles, 2002), ambas toxinas pueden manifestarse juntas o sólo una de ellas para causar daño a las células epiteliales (Chávez-Bravo *et al.*, 2007; Gómez-Duarte, 2014).

Las toxinas LT y ST 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 también iones. La enfermedad 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 (Rodríguez-Angeles, 2002).

***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC o ECEI)**

Históricamente, EIEC se describió por primera vez en 1944, cuando se llamó *Paracolobacillus*, pero luego se identificó como *E. coli* O124 (Lan *et al.*, 2004). La cepa de EIEC es descarboxilasa negativa, no móvil y lactosa negativa (Rodríguez-Angeles, 2002). Presenta una distribución mundial y se ha reportado como causa frecuente de diarrea en distintos lugares del mundo (Molina y Eslava, 2015),

produciendo diarrea con sangre que como sucede con otros agentes invasivos puede ir precedida por una diarrea acuosa inicial (Fernández-Ferrán *et al.*, 2003) acompañada de sangre y moco (Farfán-García *et al.*, 2016), de igual manera puede causar una colitis inflamatoria invasiva y, en ocasiones, disentería (Karper *et al.*, 2004); dichas cepas se internalizan y reproducen dentro del citoplasma de las células epiteliales, a las que destruyen y de igual forma penetran a los macrófagos (Molina y Eslava, 2015).

Las EIEC están relacionadas bioquímica, genética y patogénicamente con *Shigella* spp. (Robins-Browne y Hartland, 2002; Karper *et al.*, 2004; Lan *et al.*, 2004). Estudios filogenéticos de RNA ribosomal y de análisis de ADN de los plásmidos de virulencia indican que EIEC es un ancestro cercano a *Shigella* (Gómez-Duarte, 2014). Las EIEC se distinguen de *Shigella* por algunas pruebas bioquímicas menores, pero estos patotipos comparten factores de virulencia esenciales (Karper *et al.*, 2004).

Las cepas de EIEC se asocian más a brotes que a casos aislados, en lo que la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños sobre seis meses de edad. En los individuos infectados, EIEC evade la respuesta inmune porque entra fácilmente a las células epiteliales del colon por medio de adhesinas (Farfán-García *et al.*, 2016), 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 bacteria dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. Además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea (Rodríguez-Angeles, 2002; Robins-Browne y Hartland, 2002).

A pesar de que las EIEC son invasivas, la diseminación de la bacteria más allá de la submucosa es rara. Gran parte de su patogenia parece ser el resultado de los múltiples efectos de su sistema de secreción de tipo III transmitido por plásmidos, que secreta múltiples proteínas, que median los eventos de señalización epitelial, los reordenamientos del citoesqueleto, la captación celular, la lisis de la vacuola endocítica y otras acciones (Karper *et al.*, 2004).

Aunque el sistema de secreción tipo III ampliamente caracterizado es esencial para la característica invasiva de dicha especie, se han descrito factores de virulencia adicionales, que incluyen la serina proteasa SepA codificada por plásmidos, el sistema de adquisición de hierro con aerobactina codificado cromosómicamente y otras proteasas secretadas que están codificadas por genes presentes en islas de patogenicidad (Karper *et al.*, 2004).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC o ECEA)**

Entre las diferentes categorías de *E. coli* destaca *E. coli* enteroagregativa (ECEA), asociada con casos de diarrea aguda o persistente en niños y adultos tanto en países en desarrollo como en países desarrollados, y han sido identificadas como la causa de varios brotes a nivel mundial (Arias *et al.*, 2004; Karper *et al.*, 2004; Molina y Eslava, 2015; Farfán-García *et al.*, 2016). El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días (Rodríguez-Angeles, 2002).

Las cepas ECEA derivan su nombre de la forma de adherencia que presentan, la que se caracteriza por la formación de estructuras conocidas como fimbrias de adherencia-agregativa (AA: aggregative- adherence) a células HEp-2 y HeLa descrito como “apilación de ladrillos” (Farfán-García *et al.*, 2016), estas estructuras están relacionadas con la familia de adhesinas fimbriales (Dr). Cabe señalar, sin embargo, que no todas las cepas de ECEA se adhieren gracias a las fimbrias AA. Una proteína recientemente descrita llamada dispersina forma una capa poco asociada en la superficie de las cepas de ECEA y parece contrarrestar los fuertes efectos agregantes de la adhesina AA, quizás facilitando la propagación a través de la superficie de la mucosa o la penetración de la capa mucosa (Karper *et al.*, 2004).

Estudios realizados sugieren tres etapas en la infección: 1) adherencia a la mucosa intestinal mediante fimbrias de adherencia agregativa u otros factores; 2) la estimulación de la producción de moco, con la formación de una biocapa en la superficie de la mucosa; y 3) toxicidad hacia la mucosa, que se manifiesta por la liberación de citocinas, exfoliación celular, secreción intestinal e inducción de la inflamación de la mucosa (Molina y Eslava, 2015).

Esta bacteria presenta una proteína llamada Pet (plasmid-encoded toxin) toxina codificada por el plasmido, la cual tiene la capacidad de producir efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por arredondamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina, se ha descrito también la proteína Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa (Rodríguez-Angeles, 2002).

***Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC o ECAD)**

Este patotipo se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años (Rodríguez-Angeles, 2002), asociándose a procesos diarreicos de tipo agudo, sin embargo tanto adultos como niños pueden ser portadores asintomáticos. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. Dentro de las principales características observadas en la patogénesis de DAEC se encuentran la unión mediante adhesinas a la mucosa intestinal, formación de microcolonias típicas en forma de ladrillos apilados, la producción de citotoxinas y enterotoxinas, y el desarrollo de una inflamación grave de la mucosa (Farfán-García *et al.*, 2016).

Las cepas de DAEC expresan: adhesinas afimbriales (Afa), involucrada en la adherencia difusa y adhesinas fimbriales (Dr) (Farfán-García *et al.*, 2016). Dichas cepas se definen por la presencia de un patrón característico y difuso de adherencia a las monocapas de células HEp-2, observándose la inducción de algunas proyecciones de la membrana celular (Riveros *et al.*, 2011). Estas bacterias inducen un efecto citopático que se caracteriza por el desarrollo de extensiones celulares largas, que envuelven las bacterias adherentes (Karper *et al.*, 2004).

Las adhesinas se encuentran en la superficie de la membrana externa de la bacteria, confiriéndole el principal mecanismo de patogenicidad. Se subdividen en dos clases, la típica Afa/DrECAD y la atípica Afa/DrECAD que tienen como características la misma organización genética y la unión al factor de aceleración (hDAF: human decayaccelerating factor) (Farfán-García *et al.*, 2016).

2.3.2.4. Género *Pseudomonas*

Las especies que se encuentran en este género, son bacilos aerobios, no fermentadores de la glucosa, catalasa positivos, con flagelos polares, que no forman esporas. Algunas especies son psicrófilas, es decir son capaces de vivir a bajas temperaturas (Pinzón-Junca, 2019). Algunas de las especies que se encuentran en este género son, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa*, siendo esta última la de mayor importancia médica (Mallolas-Masferrer y Vila-Estapé, 2002).

Pseudomonas aeruginosa

Fue aislada en cultivo puro de heridas cutáneas por primera vez en 1882 por Carle Gessard (Luján-Roca, 2014). Esta bacteria puede ser parte de la flora normal en los humanos (Gómez-Álvarez *et al.*, 2005) aunque la prevalencia de colonización en individuos sanos fuera del ambiente hospitalario es relativamente baja (0-24 %) (Batlle-Almodóvar *et al.*, 2005). En su gran mayoría, las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* están relacionadas al ambiente hospitalario, constituyendo un grave problema clínico, de la cual se han descrito infecciones en pacientes quemados, con infección de tracto urinario, con cáncer, neutropénicos y neonatos (Luján-Roca, 2014).

Es un bacilo muy versátil, es oxidasa positiva, no fermentador y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C (Gómez Álvarez *et al.*, 2005; Luján-Roca, 2014). Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de los pigmentos piocianina, de color azul, y pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración (Luján-Roca, 2014).

Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, s.f.) que puede medir 1.5 a 5 µm de largo y, un diámetro de 0.5 a 1.0 µm (Ruiz-Martínez, 2007), en relación con su metabolismo, es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), catalasa positivo y oxidasa positivo (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, s.f.). Es un bacilo no formador de esporas, móviles, debido a la presencia de

un flagelo polar o en ocasiones hasta tres flagelos. La morfología colonial típica es alargada y plana, con el centro elevado (Ruiz-Martínez, 2007).

Pseudomonas aeruginosa produce una amplia variedad de factores de virulencia y causa un amplio espectro de enfermedades por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descrita como multifactorial (Andueza *et al.*, 2015; Luján-Roca, 2014). Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias (*pili*), matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelículas (Luján-Roca, 2014).

Es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí (Luján-Roca, 2014). Entre los mecanismos intrínsecos se encuentra la reducción de la permeabilidad que tiene la membrana plasmática a los antimicrobianos (Ossa-Giraldo *et al.*, 2014), dada principalmente por las bombas de expulsión, estas son complejos enzimáticos de membrana, que expulsan de la célula detergente y sustancias anfipáticas que de otra manera destruirían la bacteria. Uno de estos complejos es el llamado MexAB_OprM, el cual se compone de una proteína bomba en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa, este complejo tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y en contra de un gradiente de concentración: B-lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim (Gómez-Álvarez *et al.*, 2005).

La farmacorresistencia de este microorganismo está relacionada con diferentes mecanismos tales como presencia de β -lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales (Gómez-Álvarez *et al.*, 2005; Gonzales-Escalante *et al.*, 2013).

Pseudomonas aeruginosa posee una β -lactamasa cromosómica inducible tipo AmpC, que produce resistencia a piperacilina, aztreonam, ceftazidima y cefepima. También posee β -lactamasas plasmídicas, carbapenemasas tipo metalo- β -lactamasas y una nucleotidil-transferasa y acetil-transferasa, que actúan sobre los aminoglucósidos. Otro mecanismo de resistencia de esta bacteria es la alteración de los sitios blanco de los antimicrobianos como ocurre con las fluoroquinolonas, en los

cuales se han observado mutaciones sobre el gen *gyr* que codifica la subunidad A de la enzima ADN girasa, además de la alteración de las porinas, que impide la entrada del compuesto al microorganismo (Ossa-Giraldo *et al.*, 2014).

Las mutaciones de porinas transmembranales son muy importantes en la resistencia a los antibióticos, ya que limita la penetración de pequeñas moléculas hidrofílicas, excluye las moléculas más grandes, por eso es que solo pequeños antibióticos hidrofílicos tales como los β -lactámicos y las quinolonas pueden atravesar la membrana externa a través de canales acuosos constituidos en el interior de unas proteínas designadas porinas. Las bombas de eflujo forman un sistema eficiente de expulsión de los antibióticos, dichas bombas pertenecen a la familia *resistance-nodulation-division* (RND) (Luján-Roca, 2014).

Además, posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones (Luján-Roca, 2014) y su tendencia a colonizar superficies en forma de una biocapa la convierten en impermeable a las diversas concentraciones terapéuticas de los antibióticos. Por otra parte, este patógeno presenta plásmidos de resistencia, los cuales puede transferir por medio de procesos bacterianos de transducción y conjugación (Batlle-Almodóvar *et al.*, 2005).

2.4. TOXICIDAD

En la naturaleza existen numerosas sustancias, no sólo inorgánicas como compuestos arsenicales, de plomo, de radio, etc., sino también biológicos, como toxinas bacterianas, micotoxinas, alcaloides, glucósidos y muy diversas biotoxinas, sintetizados como productos metabólicos o como sustancias defensivas contra depredadores (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009), producidos por plantas, bacterias, microhongos y hongos, etc.

Para referirnos a la toxicidad de una sustancia o comparar entre sí dos tóxicos, es necesario utilizar ciertos criterios o parámetros de toxicidad que proporcionen una indicación de la peligrosidad de dichas moléculas sobre los humanos o cualquier otro organismo. Se pueden distinguir tres tipos de parámetros o criterios de toxicidad: índices de toxicidad, los cuales se determinan en el proceso de evaluación

toxicológica; límites tolerables de exposición y concentraciones máximas permisibles (Pla *et al.*, 2012).

El índice de toxicidad es una medida cuantitativa de la toxicidad de una sustancia determinada experimentalmente en animales de laboratorio; se distingue entre índice de toxicidad aguda e índice de toxicidad para dosis repetidas (toxicidad subcrónica y crónica) (Pla *et al.*, 2012). Es aguda cuando se refiere a una gran dosis de compuestos tóxicos pero de corta duración, cuyos efectos son fatales por lo general, y la crónica, ocasionada por bajas concentraciones durante largos períodos. Las pruebas de toxicidad aguda son cortas y permiten estimar las concentraciones de los compuestos que causan una respuesta en un tiempo determinado, tales como la concentración letal media (CL₅₀), a la cual muere el 50% de los organismos en diferentes tiempos, y la concentración efectiva (EC), que es aquella que causa un efecto que no es la muerte (Pinilla-Agudelo, 1998).

La intensidad de toda reacción químico-biológica y, por tanto, tóxica, depende de una serie de circunstancias, como pueden ser: la dosis y, consecuentemente, la concentración a la que el producto libre y activo se encuentra en el lugar del receptor, de igual forma, la capacidad del tóxico para atravesar las barreras biológicas hasta llegar a los receptores sin sufrir destrucción o eliminación y las condiciones de sensibilidad del receptor; estas circunstancias son, a su vez, función de una serie de factores que modifican a su vez la toxicidad de un producto como son: los factores exógenos o del medio, factores endógenos del individuo, condiciones de la absorción, cambios crono y cosmobiológicos, etc. (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009)

Las plantas medicinales pueden ser tóxicas de acuerdo al tipo de metabolitos secundarios que producen y esta toxicidad puede variar dependiendo de distintos factores que se relacionan con el tipo y cantidad de compuestos químicos, las variaciones climáticas y la época del año ya que pueden influir en la composición cuali y cuantitativa de sus principios activos, lo que influye también el efecto de la parte de la planta utilizada (Ríos *et al.*, 2012).

Aunque la variedad de metabolitos secundarios que producen las plantas es muy amplia, existen algunos grupos que predominan o que tienen una mayor relevancia toxicológica como pueden ser los nitratos, glucósidos cianogénicos, glucósidos cardiotoxicos, alcaloides pirrolizidino, lectinas, inhibidores de proteasa, oxalatos, saponinas y taninos (Díaz-González, 2010).

Desde 1982 se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de la toxicidad con la utilización de “camarones de mar” (*Artemia salina*); los cuales son utilizados como vía inicial de tamizaje tóxico de extractos crudos, fracciones y compuestos depurados, principalmente de plantas, para discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad. Debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro*, ha demostrado ser un método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios relacionados con actividades biológicas interesantes (Galvis-García *et al.*, 2012).

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Este método, en el cual se determina el valor de la concentración letal media (CL₅₀) de compuestos y extractos en medio salino, ha sido utilizado para la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y para predecir citotoxicidad de compuestos puros, de igual forma ha sido empleado con eficiencia para detectar componentes con acción citotóxica. Con vistas a correlacionar la acción tóxica mostrada por extractos de plantas con otras actividades biológicas o con la presencia de determinados componentes químicos; varios autores reportan una clasificación de la toxicidad según el valor de la CL₅₀ del extracto. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar los extractos con CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 µg/mL se clasifican como no tóxicos (Fernández-Calienes *et al.*, 2009).

Artemia spp. son pequeños camarones de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados

“monos de mar” o “brine shrimp” en inglés. El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales y varias poblaciones partenogenéticas, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, *Artemia franciscana* Kellogg (bisexuales) y *Artemia partenogenetica* Bowen y Sterling. Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados (Pino-Pérez y Jorge-Lazo, 2010).

Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7 mm. *Artemia* es el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos. Por razones prácticas, las especies con un estado criptobiótico, durante su ciclo de vida son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar (Pino-Pérez y Jorge-Lazo, 2010).

Algunas de las ventajas al utilizar este método son: que no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente, las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario y se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica. El ensayo permite la evaluación rápida y conveniente de extractos, además de comparar varias partes de la planta y establecer variaciones estacionales en plantas individuales (Pino-Pérez y Jorge-Lazo, 2010).

La importancia de conocer la toxicidad tiene relación con el consumo de la mayoría de las plantas medicinales en todo el mundo se realiza sin receta, con escasa información para el consumidor y muchas veces sin controles suficientes para garantizar la calidad de los productos comercializados. La Oficina de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration: FDA) ha informado de 185 muertes, en un periodo de cinco años, asociadas al consumo de plantas

medicinales, por ello en los últimos años, estas han empezado a tener una regulación más estricta por parte de las autoridades, principalmente por la existencia de informes de toxicidad en la literatura científica (Ríos *et al.*, 2012).

III. ANTECEDENTES

La información acerca de las especies utilizadas en esta investigación es escasa, por ello se buscaron publicaciones en la bibliografía especializada en donde emplean algunas especies del género. En la búsqueda de información especializada sobre la especie *G. stolzeana*, hasta el momento no se ha encontrado ningún reporte de investigación, por lo que se describen algunos trabajos realizados con géneros pertenecientes a la familia:

Pereira Da-Silva y Antunes De-Paiva (2012) identificaron grupos de metabolitos secundarios en distintos clados pteridofíticos, permitiendo así, inferir posibles efectos terapéuticos. Su análisis lo realizaron con extractos hidroalcohólicos de frondas de adultos y expandidos estériles de *Phymatodes scolopendria*, y fértiles y estériles de *Nephrolepis pectinata* y *Thelypteris dentata*, estos fueron acondicionados en bolsas plásticas humedecidas, para posteriormente lavarlo, fragmentarlo y parte del material fue estabilizado en invernadero con ciclo de aire a la temperatura de 45°C por 72h. Las pruebas fitoquímicas se realizaron en drogas frescas y deshidratadas para todas las especies, bajo la metodología de Matos (1988). De acuerdo con las pruebas realizadas, obtuvieron que, los metabolitos encontrados en los extractos hidroalcohólicos, tanto de material fresco como seco, fueron los taninos condensados, catequinas y saponinas. Los autores de acuerdo a literatura consultada pudieron relacionar la utilización de la fronda de *Nephrolepis pectinata* para actividades hemostáticas y el uso de *Thelypteris dentata* para problemas estomacales.

Raj *et al.* (2011) estudiaron la morfología, bioquímica y bioactividad de las glándulas epidérmicas del morfotipo glandular de *Christella parasítica*. La recolecta del material la realizaron en Kakachi Tirunelveli Hills en los Ghats Occidentales de India, los estudios morfológicos los llevaron a cabo utilizando un microscopio óptico y un electrónico de barrido; el extracto lo obtuvieron con acetona, el análisis de actividad antibacteriana lo llevaron a cabo por el método de disco de papel filtro; también realizaron un estudio de toxicidad utilizando larvas de mosquito y renacuajos de rana. En los estudios microscópicos encontraron que las glándulas se distribuyen sobre la

superficie inferior de la costa y venas, y se encontraban en mayor número en hojas jóvenes, de igual forma, observaron que las glándulas eran de color naranja brillante y alargadas, con superficie lisa y ápice apiculado. Entre los grupos de metabolitos secundarios identificaron alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, saponinas, taninos y azúcares. El extracto mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus albus*, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; el estudio de toxicidad, mostró que los extractos en diferentes concentraciones produjeron alta mortalidad en los dos tipos de larvas utilizadas.

Vincent y Kanna (2007) probaron la actividad antimicrobiana de extractos acuosos y de acetona de las glándulas epidérmicas de los helechos, *Christilla parasitica* y *Cyclosorus interruptus*, sobre *Salmonella Typhi*. Los helechos fueron colectados en Ghats Occidentales del Sur de India; se dejaron secar bajo sombra, posteriormente las frondas se sumergieron tanto agua y acetona para disolver las glándulas epidérmicas. Este extracto se concentró por destilación y se secó a temperatura ambiente. Realizaron el estudio antibacteriano utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Los resultados mostraron que los extractos de acetona de ambos helechos muestran un efecto notable en *S. Typhi* cuando se usan individualmente, pero los acuosos no.

De la especie *A. amplum* tampoco se encontraron reportes especializados, pero si existen estudios acerca de especies del mismo género:

Muhammad-Saqib *et al.* (2014) realizaron un estudio evaluando las propiedades fitoquímicas, antibacterianas y antifúngicas de extractos obtenidos de *Adiantum capillus-veneris*, con metanol, etanol, agua, acetato de etilo y hexano de hojas, tallos y raíces, colectado en diferentes áreas de Swat y Peshawar en Pakistán, contra cepas bacterianas de *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Providencia sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *S. Typhi*, *Shigella sp.*, *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, obtenidas de los laboratorios del hospital Lady Reading, Peshawar y el Consejo de Investigación Científica e Industrial de Pakistán. También se ensayaron los hongos *Candida albicans*, *Pythium*, *Aspergillus flavis*, *A. niger* y *Trichoderma sp.*, del laboratorio de microbiología de la Universidad de Abasyn Peshawary. Para la

obtención de los extractos, se separaron y molieron las estructuras, se remojaron 100 g de cada parte vegetal en un litro con cada solvente durante 24 h a 25°C, después se rotoevaporaron. Se determinaron los valores de: cenizas de toda la planta se obtuvo por el método de Premnath *et al.* (2012); humedad determinada por el método de Ashutosh *et al.* (2009), y el rendimiento (valores extractivos) de cada uno de los extractos obtenidos mediante el método de Singh *et al.* (2013). También realizaron diferentes tipos de pruebas fitoquímicas para detectar la presencia de diferentes grupos de metabolitos. Realizaron el método FTIR (espectroscopía infrarroja transformada de Fourier), para todos los extractos en forma seca por el método de Meenambal *et al.* (2012). La actividad antibacteriana de los quince extractos de *A. capillus-veneris* la evaluaron por el método de difusión en disco de Janovska *et al.*, (2003) con algunas modificaciones, también realizando una prueba de sensibilidad a catorce antibióticos; la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos, la llevaron a cabo por el método de difusión en pozos de Mbaveng *et al.* (2008).

El mayor valor de extracción correspondió al de metanol de hoja con 35% y el de menor porcentaje fue el de hexano de tallo con 2.75%. Las pruebas fitoquímicas mostraron alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides, en todos los extractos, mientras que glucósidos y azúcar reductores solo en extractos acuosos y metanólicos, y los terpenoides estuvieron ausentes en extractos de acetato de etilo de hojas y hexano con tallo. La espectroscopía FTIR mostró la presencia de compuestos como aldehídos, amidas, alcohol, ácido carboxílico, cetona y éteres. Los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad a antibióticos, la mayoría de las cepas bacterianas analizadas eran resistentes, siendo *C. freundii* la cepa más resistente (92.8%) que mostró una sensibilidad relativamente baja (10 mm) solo a la tetraciclina (TET), *K. pneumoniae* (85.7%), que mostró sensibilidad solo a gentamicina (GEN) (15 mm) y cefoperazona-sulbactam (CZS) (15 mm), seguida por *Providencia* (85.7%), que mostró sensibilidad a la cefotaxima (CTX) (22 mm) y ceftriaxona (CRO) (18 mm). Mientras que *P. vulgaris* y *E. coli* (78.6%), y *V. cholera* y *S. Typhi* fueron 71.4% resistentes a todos los antibióticos probados. *P. aeruginosa* y *S. aureus* se encontraron resistentes al 50%, mientras que *Shigella* fue resistente al 35.8% contra los 14 antibióticos. Los extractos que mostraron una actividad antibacteriana significativa

contra todas las cepas bacterianas fueron: metanólicos de hoja (15-30 mm), tallo (18-30 mm), raíz (15-25 mm); etanólicos de hoja (16-30 mm), tallo (18-30 mm), raíz (15-25 mm); y acuosos de hoja (20-25 mm), tallo (10-20 mm) y raíz (10-30 mm).

Para el caso de las cepas fúngicas los extractos de hexano fueron los únicos que no mostraron actividad, mientras que, el extracto metanólico de hojas mostraron zonas de inhibición mayor frente a todas las levaduras, con un tamaño de 30 mm a 28 mm de diámetro, mientras que el extracto etanólico únicamente frente a *A. flavis* y *A. niger* con 28 mm de diámetro.

Young-Kang *et al.* (2009), llevaron a cabo una investigación fitoquímica de los aceites esenciales, en las raíces y hojas de *Adiantum flabellulatum*. Para identificar los componentes químicos utilizaron la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME). Posteriormente analizado por cromatografía de gases-masas (GC-MS). Como resultados obtuvieron la identificación de cuarenta y dos compuestos en las raíces de *A. flabellulatum*, que comprendieron el 94.6% de la fracción volátil. Los principales constituyentes del aceite en las raíces fueron ácido n-decanoico (11.44%), 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (11.23%), ftalato de dietilo (8.63%) y ácido nonanoico (6.15%); se identificaron treinta y ocho compuestos en las hojas, que comprendían el 91.64% de la fracción volátil, los principales constituyentes fueron ácido n-decanoico (11.77%), 2-isopropenil-4a, 8-dimetil-1,2,3,4,4a, 5,6,7-octahidronaftaleno (10.63%), [1R (1 α , 7 β , 8a α)] - 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7- (1-metileténil) -naftaleno (9.88%), α -panasinsen (8.11%), 4-tetradecyne (6.63%), β -pineno (5.16%) y ácido nonanoico (4.01%). Diecinueve compuestos se identificaron tanto en las raíces como en las hojas, el principal compuesto fue el ácido n-decanoico.

Singh *et al.* (2008), examinaron los extractos metanólicos de *Adiantum capillus-veneris*, *A. peruvianum*, *A. venustum* y *A. caudatum*, como agentes antimicrobianos, frente a las bacterias: *Micrococcus luteus* (MTCC-106), *Bacillus subtilis* (MTCC-121), *Bacillus cereus* (MTCC-430), *Enterobacter aerogenes* (MTCC-111), *Escherichia coli* (MTCC-443), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC-109), *Proteus mirabilis* (MTCC-1429), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC-424), *Staphylococcus aureus* (MTCC-96), *Salmonella Typhimurium* (MTCC-98) y *Streptococcus pneumoniae* (MTCC-2672), y

ocho hongos: *Candida albicans* (MTCC-183), *Cryptococcus albidus* (MTCC-2661), *Trichophyton rubrum* (MTCC-296), *Aspergillus niger* (MTCC-16404), *A. flavus* (MTCC-1973), *A. spinulosus* (MTCC-16919), *A. terreus* (MTCC-1782) y *A. nidulans* (MTCC-11267). Los extractos de cada especie los obtuvieron por percolación en frío en metanol (consecutivamente tres veces) a temperatura ambiente durante 24 h, los filtraron y concentraron a sequedad en un evaporador rotativo. A los extractos se les determinaron los valores de CIM por el método de microdilución utilizando como control positivo gentamicina y ketoconazol; el crecimiento microbiano se determinó usando un espectrofotómetro Ultraspec 200 UV/visible y la concentración bacteriana mínima (CBM) y la concentración micótica mínima (CMM) se determinaron con una muestra de 5 µL de cada pocillo (mostrando bien la turbidez mínima) en placas de agar sobre secadas (MHA/PDA) y luego incubadas a 37°C durante 18-24 h (bacterias) y 48-96 h (28°C) para hongos. Además realizaron un análisis fitoquímico preliminar y la cuantificación de fenoles totales.

El mayor rendimiento de los extractos metanólicos se obtuvo con *A. peruvianum* el cual correspondió al 10.2%. Los fenoles totales (p/p) variaron de 0.52% al 0.83%. Las CIM y la CBM evaluadas frente a las bacterias Gram-positivas, todas presentaron un efecto inhibitorio de las cuatro especies de *Adiantum*, a excepción de *A. caudatum* contra *S. aureus* y *Streptococcus pneumoniae*; mientras que para las Gram-negativas hubo menor efecto, pues únicamente presentó actividad, *A. venustum* contra todas las bacterias, *A. capillus-veneris* solo frente a *E. coli*, y *A. peruvianum* frente a *S. typhimurium* y *E. aerogenes*, siendo la CIM de mayor efecto (0.48 µg/mL) *A. capillus-veneris* frente a *E. coli* y una CBM de 4×10^{-12} . En el caso de las levaduras únicamente *A. peruvianum* y *A. caudatum* contra *A. spinulosus* y *A. niger* respectivamente, no presentaron actividad, siendo la CIM de mayor actividad *A. venustum* frente a *A. terreus* con valor de 0.97 µg/mL y una CBM de 3×10^{-11} .

En el cribado fitoquímico observaron la presencia de flavonoides y taninos junto con azúcar reductor en todas las especies investigadas, mientras que los triterpenoides, esteroides y glucósidos fueron ausentes en todas las especies. Las saponinas estuvieron presentes solo en *A. caudatum* y *A. venustum*.

IV. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Evaluar el efecto biológico de los grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos de diferente polaridad de frondas y rizomas+raíces de *Goniopteris stolzeana* (AR Sm.) Salino y TE Almeida y *Adiantum amplum* C. Presl.

4.2. PARTICULARES

- Identificar los grupos de metabolitos secundarios mediante pruebas colorimétricas y de precipitación.
- Estimar la actividad antimicrobiana de los extractos de frondas y rizomas+raíces de *Goniopteris stolzeana* y *Adiantum amplum* frente a las cepas Gram positivas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* y Gram negativas *E. coli* y su patotipo EPEC, *S. sonnei*, *S. Typhi*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.
- Conocer el efecto tóxico de los extractos sobre *Artemia salina*.

V. ZONA DE RECOLECTA

La recolección del material vegetal se realizó en el municipio de Villa Corzo, Chiapas (figura 11), en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) “La Tasajera” ubicada en las coordenadas 16°13'57.26” latitud norte y 93°3'53.65” longitud oeste a una altitud de 652 msnm. La UMA nos permitió la colecta mediante un permiso escrito.

El municipio de Villa Corzo se encuentra dentro de la región frailesca (Delgado-Ruiz *et al.*, 2018), en las coordenadas 16°27' latitud norte y 93°37' de longitud oeste, representando el 5.32% de la superficie del estado de Chiapas. Colinda al norte con los municipios de Villaflores y Chiapa de Corzo; al este con los municipios de Chiapa de Corzo, Venustiano Carranza y La Concordia; al sur con los municipios de La Concordia, Pijijiapan y Tonalá; al oeste con los municipios de Tonalá y Villaflores (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 1995).

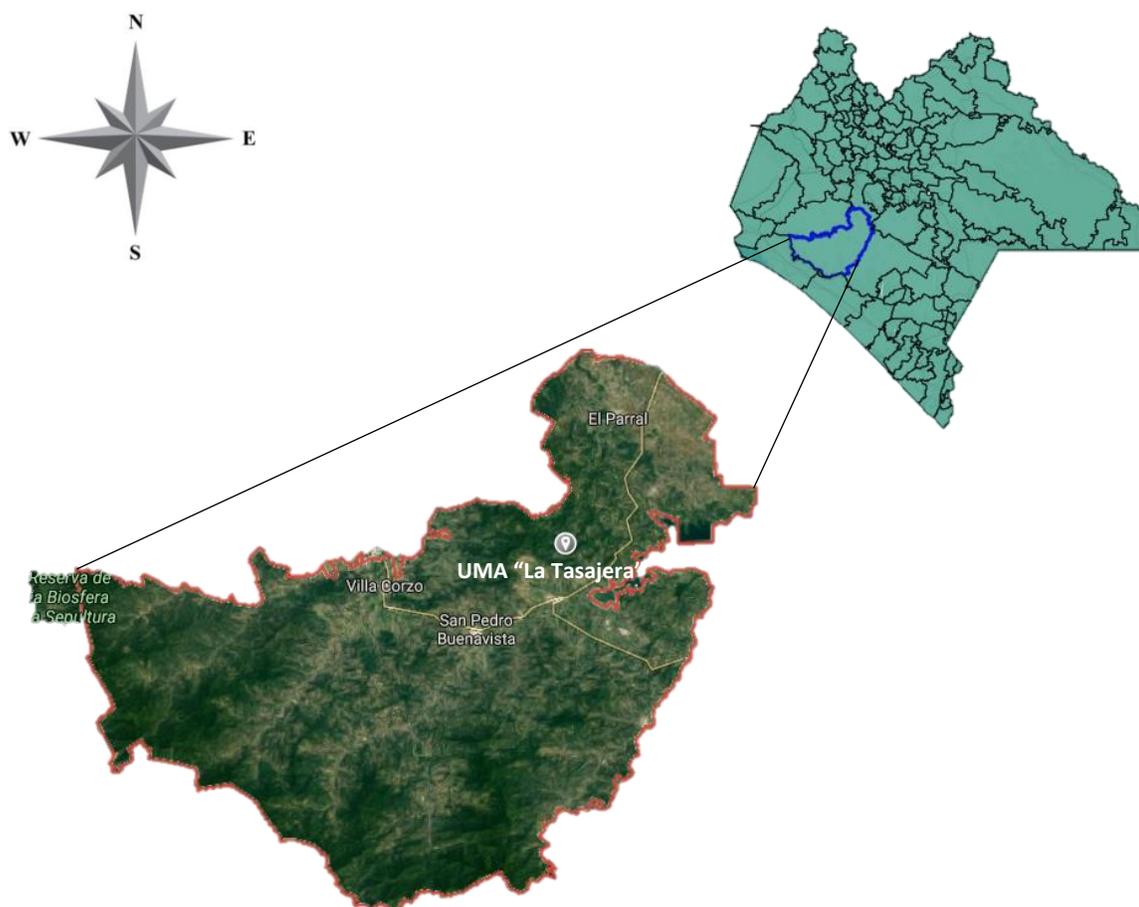


Figura 13. Ubicación de la UMA “La Tasajera”, municipio de Villa Corzo, Chiapas (INEGI, 2019 modificado con Google Maps).

5.1. TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN

En los meses de mayo a octubre, la temperatura mínima promedio va de los 12°C a los 21°C, mientras que la máxima promedio oscila entre 21°C y 34.5°C. En el periodo de noviembre-abril, la temperatura mínima promedio va de 9°C a 18°C, y la máxima promedio fluctúa entre 18°C y 33°C. En los meses de mayo a octubre, la precipitación media fluctúa entre los 1 000 mm y los 2 600 mm, y en el periodo de noviembre-abril, la precipitación media va de los 25 mm a 200 mm (Comisión Nacional del Agua [CONAGUA], s.d.).

5.2. CLIMA

Su clima varía de acuerdo a la altitud, es por ello que se presentan varios tipos de clima, como son: cálido sub-húmedo con lluvias en verano (que abarca el 74.04% de la superficie municipal); semicálido húmedo con lluvias en verano (15.20%); semicálido sub-húmedo con lluvias en verano (7.20%); cálido húmedo con lluvias en verano (2.9%) y templado húmedo con lluvias en verano (0.65%) (CONAGUA, s.d.).

5.3. SUELO

En el municipio de Villa Corzo predominan los suelos, regozol, leptosol, luvisol, cambisol, fluvisol, vertisol y phaeozem, con una cobertura de la superficie del municipio aproximada de: 46.96%, 25.82%, 14.62%, 8.71%, 0.58%, 0.19% y 0.28% respectivamente (Prontuario de Información Geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos, s.f.)

5.4. HIDROGRAFÍA

El municipio de Villa Corzo se ubica en la región hidrográfica RH30 Grijalva Usumacinta, con dos cuencas: Grijalva-Tuxtla Gutiérrez y Grijalva-La Concordia. Las subcuencas municipales son tres: subcuenca Río Santo Domingo, subcuenca Presa La Angostura y la subcuenca Río San Pedro (Ayuntamiento Constitucional Municipal de Villa Corzo, 2019).

Los ríos principales del municipio son Los Amates, El Pando, El Dorado y Nijundilo. Otras corrientes de agua son: Sabaneta, Las Marías, Candelaria, La Victoria, San Marcos, La Ermita, Blanco, Pinavetal, El Naranjo, El Chiflón, La Ciénaga, San José, Rincón Pablo, Arena, Macoíte, El Palón, Frío y San Diego. Dentro de su territorio está parte del embalse de la presa Belisario Domínguez, también conocida como La Angostura donde desembocan los ríos Nijundilo, El Dorado, Blanco, Cuxtepeques y San Vicente (Ayuntamiento Constitucional Municipal de Villa Corzo, 2019).

5.5. VEGETACIÓN

En el municipio de Villa Corzo se presentan diversos tipos de vegetación, entre ellos se pueden citar, bosque de coníferas con el 16.47%; vegetación secundaria de bosque de coníferas con el 14.89%; bosque mesófilo de montaña con el 10.17%; vegetación secundaria de selva caducifolia con el 8.5%; vegetación inducida con el 4.49%; vegetación secundaria de bosque mesófilo de montaña con el 3.92%; bosque de encino con el 3.74%; vegetación secundaria de selva perennifolia con el 2.08%; vegetación secundaria de bosque de encino con el 1.41%; pastizal con el 0.94% y vegetación secundaria de selva sub-caducifolia con el 0.12% (CONAGUA, s.d.).

5.6. DESCRIPCIÓN DE LA UMA “LA TASAJERA”

La UMA tiene una extensión territorial de 159.90 ha, con número de registro SEMARNAT-UMA-IN-0643-CHIS/14. Dentro de esta se encuentra un arroyo llamado “San Marcos” conocido también como “Ribera del dorador”, el cual nace de un vertiente en el rancho “La Joya” ubicado aproximadamente 8 kilómetros de la UMA.

La UMA maneja dos especies en modalidad intensiva, como son, venado cola blanca (*Odocoileus virginianus* Zimmermann) y tepezcuintle (*Cuniculus paca* Linnaeus), de igual forma a llevado a cabo programas de reforestación de especies nativas del lugar y divulgación y conservación de la fauna asociada a la UMA.

La información de las especies de flora y fauna presente en la UMA se ha recopilado por medio de las visitas hechas y por la información proporcionada por parte de los propietarios.

En la vegetación presente en la UMA podemos encontrar, huanacaxtle (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb), maculishuate (*Tabebuia rosea* (Bertol.) DC), nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), papausa (*Annona macrophyllata* Donn. Sm), mango ataulfo (*Mangifera indica* L.), ceiba (*Ceiba pentandra* (L.) Gaerth), algunas especies de helecho como *Blechnum polypodioides* Raddi, *Blechnum appendiculatum* Willd., *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link, culantrillo de agua (*Adiantum trapeziforme* L.) y bejuco de alambre (*Lygodium venustum* Sw.).

Como fauna asociada se encuentran, armadillo de nueve bandas (*Dasyus novemcinctus* L.), puercoespín tropical (*Coendou mexicanus* Kerr.), oso hormiguero (*Tamandua mexicana* Saussure.), zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus* Schreber.), coyote mexicano (*Canis latrans* Say.), lagarto escorpión (*Heloderma horridum* Wiegmann.), serpiente de cascabel (*Crotalus atrox* Baird & Girard.), iguana verde (*Iguana iguana* Linnaeus.), guaco (*Herpetotheres cachinnans* Linnaeus.), carpintero frentidorado (*Melanerpes aurifrons* Wagler.), garcita verde (*Butorides virescens* Linnaeus), titira enmascarada (*Tityra semifasciata* Spix.), zambullidor menor (*Tachybaptus dominicus* Linnaeus), pijije ala blanca (*Dendrocygna autumnalis* Linnaeus), pescador de collar (*Megaceryle torquatus* Linnaeus), garza nocturna (*Nyctanassa violácea* Linnaeus), trogon norteño (*Trogon caligatus* Gould), trogon (*Trogon violaceus* Gmelin), carpintero lineado (*Dryocopus lineatus* Linnaeus), cernícalo americano (*Falco sparverius* Linnaeus), tucán collarejo (*Pteroglossus torquatus* J. F. Gmelin), quebranta hueso (*Caracara cheriway* Jacquin), saltador cabeza negra (*Saltator atriceps* Lesson), tecolote bajo (*Glaucidium brasilianum* J. F. Gmelin), cuclillo canelo (*Piaya cayana* Linnaeus), colibrí picudo occidental (*Helimaster constantii* Delattre), garza morena (*Ardea herodias* Linnaeus), cormorán Neotropical (*Phalacrocorax brasilianus* Gmelin), águila pescadora (*Pandion haliaetus* Linnaeus), garza purpura (*Egretta caerulea* Linnaeus), pájaro péndulo (*Momotus mexicanus* Swainson), saltapared barrado (*Thryothorus pleurostictus* P. L. Sclater), cuclillo crespín (*Tapera naevia* Linnaeus), calandrai dorso rayado (*Icterus pustulatus* Wagler), cuclillo terrestre (*Morococcyx erythropygus* Lesson), carpintero bellotero (*Melanerpes formicivorus* Swainson), aguililla gris (*Buteo plagiatus* Schlegel) y colibrí frentiverde (*Amazilia viridifrons* D. G. Elliot).

VI. MÉTODO

6.1. MUESTRA VEGETAL

Se recolectaron plantas completas de *G. stolzeana* y *A. amplum* en 2018, entre las 11:00 am y 1:00 pm, en la temporada de lluvias, en la Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) “La Tasajera”, ubicada en el municipio de Villa Corzo, Chiapas. Los helechos se trasladaron al laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

Las partes utilizadas para la obtención de los extractos fueron dos: 1) las frondas (hojas completas de los helechos), que incluyen el estipe (pecíolo) y lámina (raquis y pinnas) y, 2) el rizoma (tallo), junto con las raíces, abreviados en esta investigación como rizomas+raíces (Ri+Ra). Las partes vegetales se denominaron de acuerdo a The New York Botanical Garden (1999); American Fern Society (2021) y United States Department of Agriculture (s.d.).

Las partes vegetales que presentaron plaga, estuvieron deterioradas o marchitas se desecharon, posteriormente se separaron frondas y rizomas+raíces, se lavaron para eliminar el polvo, después se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente; una vez deshidratadas se molieron hasta obtener un polvo fino.

También se recolectaron ejemplares para herbario que se secaron, prensaron, identificaron y depositaron en el herbario Eizi Matuda del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH.

6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE MACERACIÓN

De ambas especies se pesaron 193 gramos de frondas y 160 gramos de rizomas+raíces a los que se les agregaron 780 mL y 680 mL respectivamente de los disolventes hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH), dejando en contacto el material vegetal durante 24 horas, transcurrido este tiempo se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio a 120 rpm a temperaturas de 69°C (hexano), 77°C

(AcOEt) y 65°C (MeOH). El extracto concentrado se depositó en un frasco limpio previamente pesado y el solvente se colocó de nuevo con el material vegetal por otras 24 horas, este procedimiento se realizó por triplicado para cada solvente (Figura 14).

El disolvente se termina de evaporar a temperatura ambiente, después se pesó el extracto en una balanza analítica estándar. Finalmente se determinó el rendimiento (%) de cada extracto seco, por diferencia de pesos.

6.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE DECOCCIÓN

El extracto acuoso se obtuvo por decocción o cocimiento, para ello se pesaron 190 gramos de frondas y 175 gramos de rizomas+raíces, se agregaron 758 mL y 700 mL de agua destilada respectivamente, se colocó en una placa de calentamiento dejando hervir por 15 minutos después se dejó enfriar por 10 minutos, posteriormente se filtró el extracto para eliminar los residuos y se dejó evaporar a sequedad en condiciones de luz y temperatura ambiente (Figura 14).

Se pesaron los extractos en una balanza analítica estándar y se determinó el rendimiento (%) de cada extracto ya seco por diferencia de pesos.

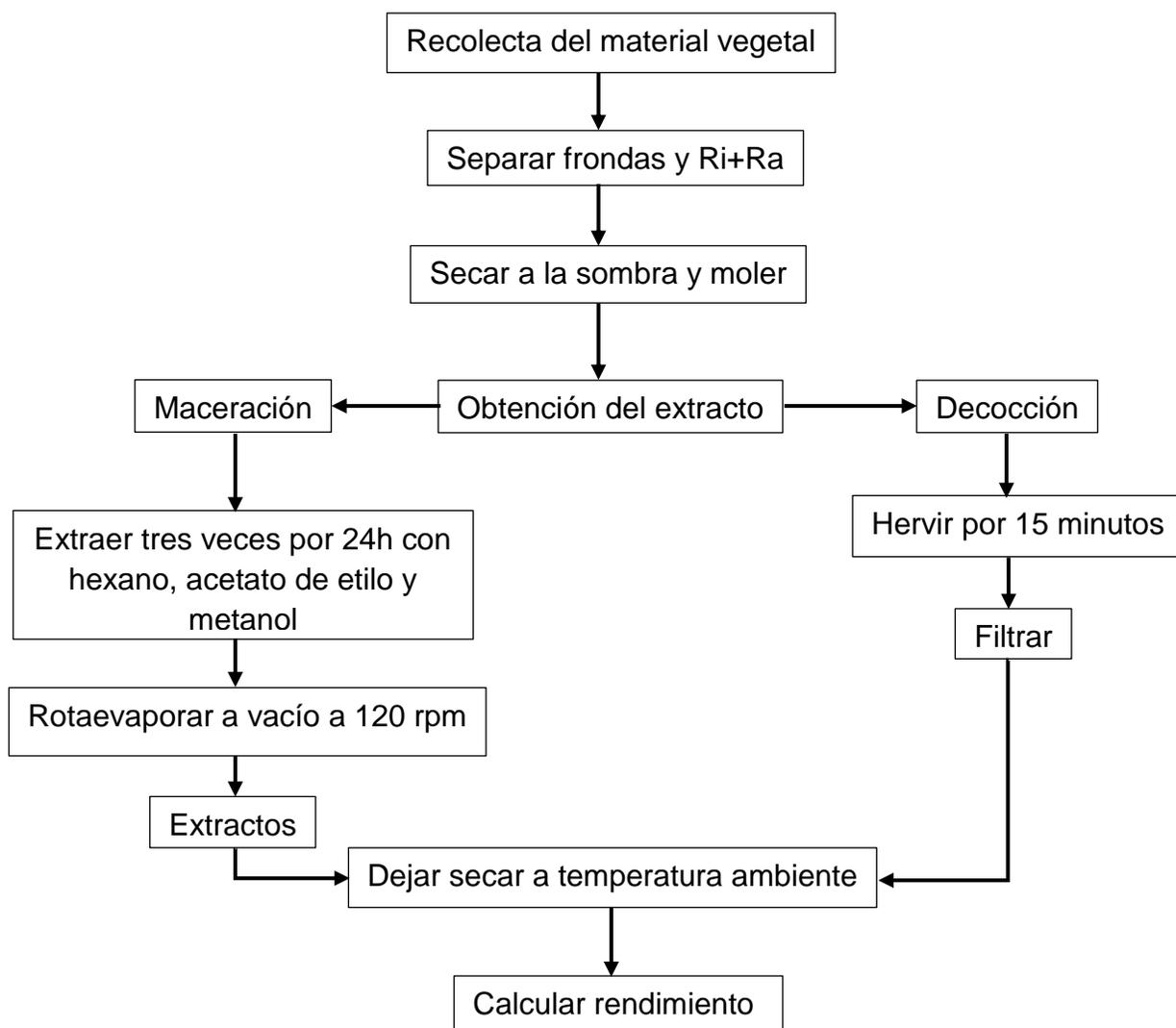


Figura 14. Obtención de los distintos tipos de extractos.

6.4. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS (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. Después, se distribuyó 1 mL de la solución anterior en tubos de ensayo (una serie de tubos por cada tipo de extracto), y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente. 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 (-).

Las pruebas colorimétricas y de precipitación (Figura 15) empleadas en este trabajo fueron las siguientes (Domínguez, 1973):

Alcaloides (Prueba con el reactivo de Dragendorff)

Se añadió 1 mL HCL al 10%, y dos gotas del reactivo de Dragendorff. Un precipitado marrón indicó la presencia de este metabolito.

Fenoles (Prueba de cloruro férrico)

Se agregó 1 mL de etanol más tres gotas de FeCl_3 al 3% en etanol. La aparición de una coloración verdosa correspondió a una reacción positiva.

Flavonoide (Prueba de Shinoda)

Se añadió 1 mL etanol más tres trocitos de magnesio y dos gotas de HCl concentrado. El desarrollo de un color naranja indicó la presencia flavona, color rojo para flavonona, rojo azulado para flavonol y violeta para xantinas.

Glucósidos (Prueba de Molish)

Se le añadió 1 mL de etanol, luego se agregaron 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 indicó una reacción positiva (Plumer, 1981).

Saponinas (Prueba de espuma)

Se agregó 1 mL de agua destilada, se tapó y agitó durante 30 segundos, la aparición de espuma y su permanencia durante 2 minutos indicó la presencia de saponinas.

Taninos (Prueba para taninos hidrolizables y condensados)

Se añadió 1 mL de agua y dos gotas de solución acuosa de FeCl_3 al 2%. La aparición de una coloración azul indicó que se trataba de taninos hidrolizables y una coloración verde la presencia de taninos condensados (método modificado de Salem *et al.*, 2013).

Terpenos-esteroides (Prueba de Liebermann-Buchard)

Se añadió 1 mL de cloroformo y 1 mL del reactivo de Liebermann-Buchard. Se tomó como una reacción positiva para esteroides si se desarrolló una coloración azul o azul verde, y si se trata de terpenos una coloración rojo, rosa o violeta (Domínguez, 1973).

Lactonas sesquiterpénicas o Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baltej)

Se agregó 1 mL de etanol al extracto y se agitó. Posteriormente se le añadió 1 mL del reactivo de Baljet. La presencia una coloración roja (++) o precipitado de color rojo (+++) indica una prueba positiva (Miranda-Martínez, 2002).

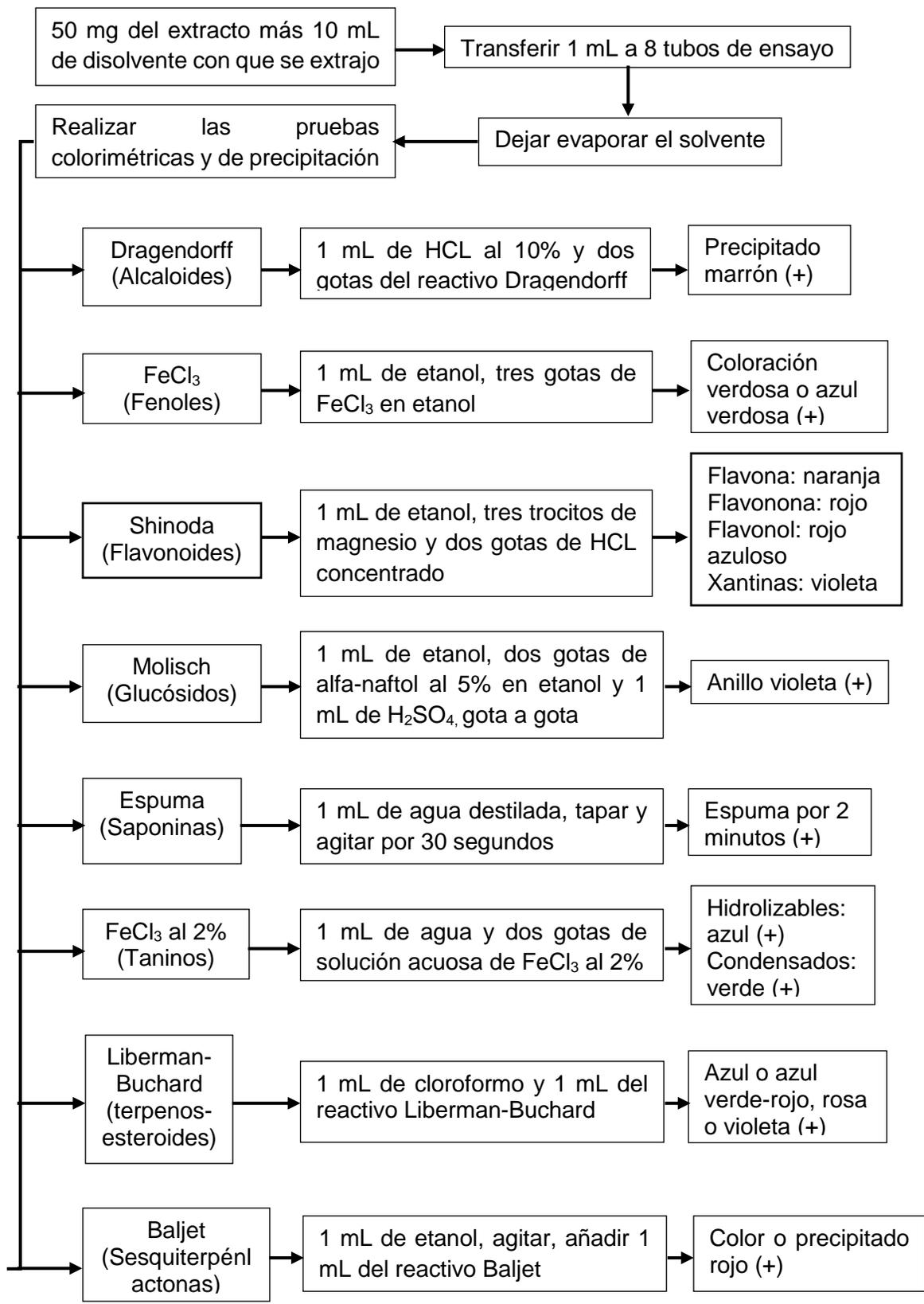


Figura 15. Pruebas para identificar grupos de metabolitos secundarios.

6.5. MICROORGANISMOS EVALUADOS

Se ensayaron las cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) y las Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25923), *E. coli* enteropatógena, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), *Salmonella Typhi* (ATCC 6539) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Las bacterias fueron resembradas en agar nutritivo e incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24 horas, se realizaron frotis para determinar el tipo de Gram y, pruebas bioquímicas para corroborar la especie. Se resembraron y mantuvieron en agar inclinado.

6.6. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) (Sarker *et al.*, 2007)

Se preparó una solución madre de cada extracto con DMSO en concentración de 96 mg/mL. En una placa estéril de 96 pozos (Brandplates®) se realizan los controles: positivo (gentamicina + caldo + bacteria + resazurina) y el negativo (DMSO + caldo + bacteria + resazurina). Se colocaron en el primer pocillo 200 μL de la solución madre, a partir de este se realizaron transferencias de 100 μL para obtener las siguientes diluciones seriadas: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 y 0.0390625 mg/mL. Después se añadió a cada pocillo el inóculo estandarizado a 1.8 unidades formadoras de colonias por mL (1.8 UFC/mL) y solución de rezarurina (Sigma®).

Las placas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 18 horas. Al finalizar el periodo de incubación se observó la coloración de cada pozo: color rosa indicó crecimiento y azul inhibición del crecimiento, determinando entonces el valor de la CIM para cada microorganismo, la cual es definida como la menor concentración del agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento. Las placas se realizaron por duplicado (Figura 16).

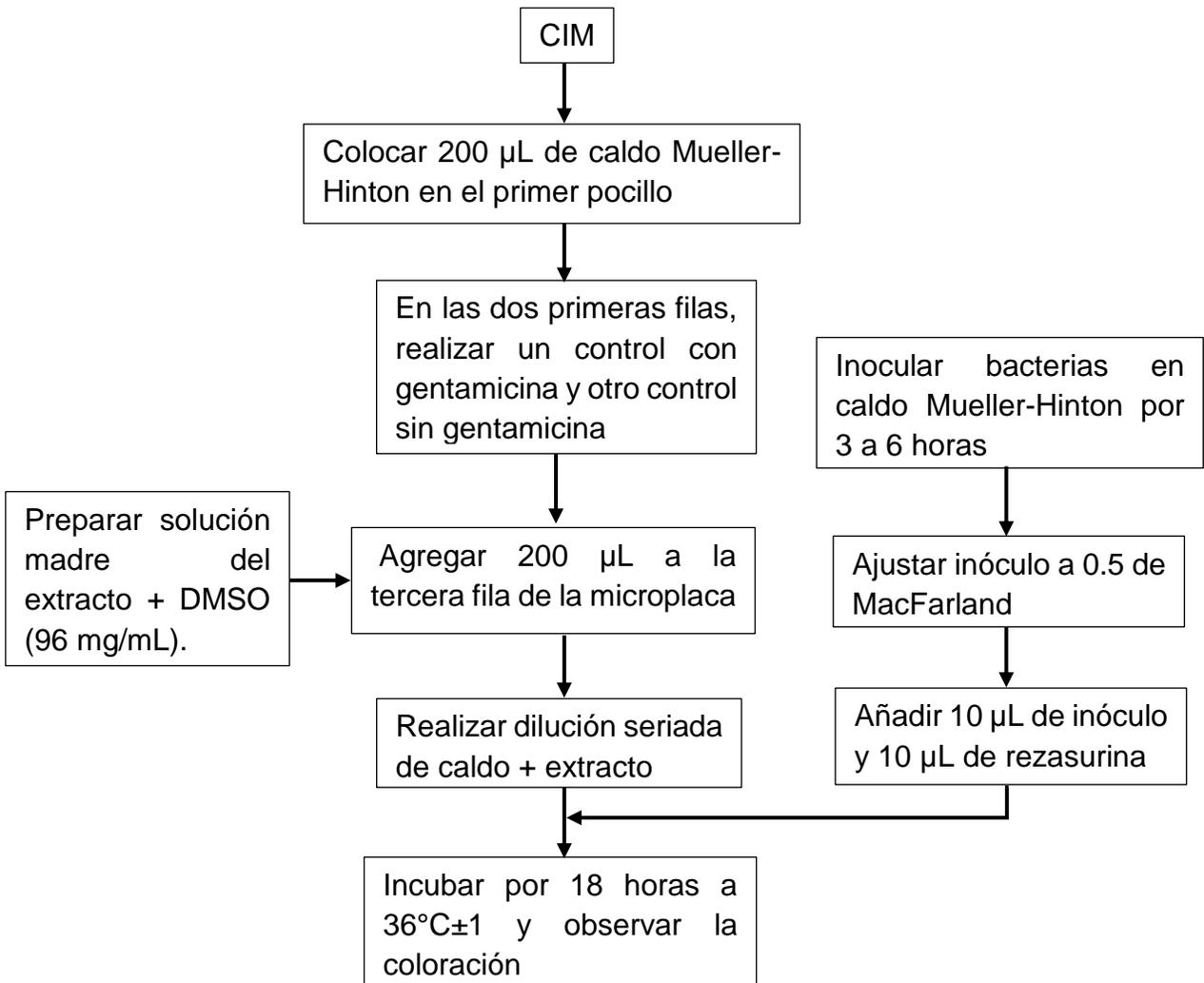


Figura 16. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

6.7. PRUEBA DE TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina* (McLaughlin *et al.* 1998)

Se construyó una pecera con agua salina para eclosionar huevecillos de *A. salina* en un recipiente dividido en dos partes, una totalmente oscura y la otra descubierta, separadas por una tira de unicel con perforaciones, en la que se depositó agua salina, se iluminó con un foco de 60 watts a una distancia de 1 metro, y se colocaron los huevecillos en la parte oscura.

Se prepararon viales de prueba, para ello se disolvieron 10 mg de extracto en 1 mL de etanol, después se transfirieron 5, 50 y 200 μ L a los viales y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente, una vez evaporado se añadieron 5 mL de agua salina y se depositaron 10 larvas del crustáceo en cada uno de los viales, obteniendo concentraciones de 10, 100 y 1 000 ppm, en cada vial, los que se mantuvieron bajo luz constante durante 24 horas (Figura 17).

Se realizó el conteo de larvas sobrevivientes a las 24 horas. Cada evaluación de los extractos se realizó por quintuplicado. Se clasificó la toxicidad de acuerdo a las categorías propuesta por Fernández-Calienes *et al.* (2009) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Categoría de toxicidad.

Concentración del extracto (μ g/mL)	Categoría
Menor a 10	Extremadamente tóxico
Entre 10 y 100	Muy tóxico
De 100 a 1 000	Moderadamente tóxico
Mayor a 1 000	No tóxico

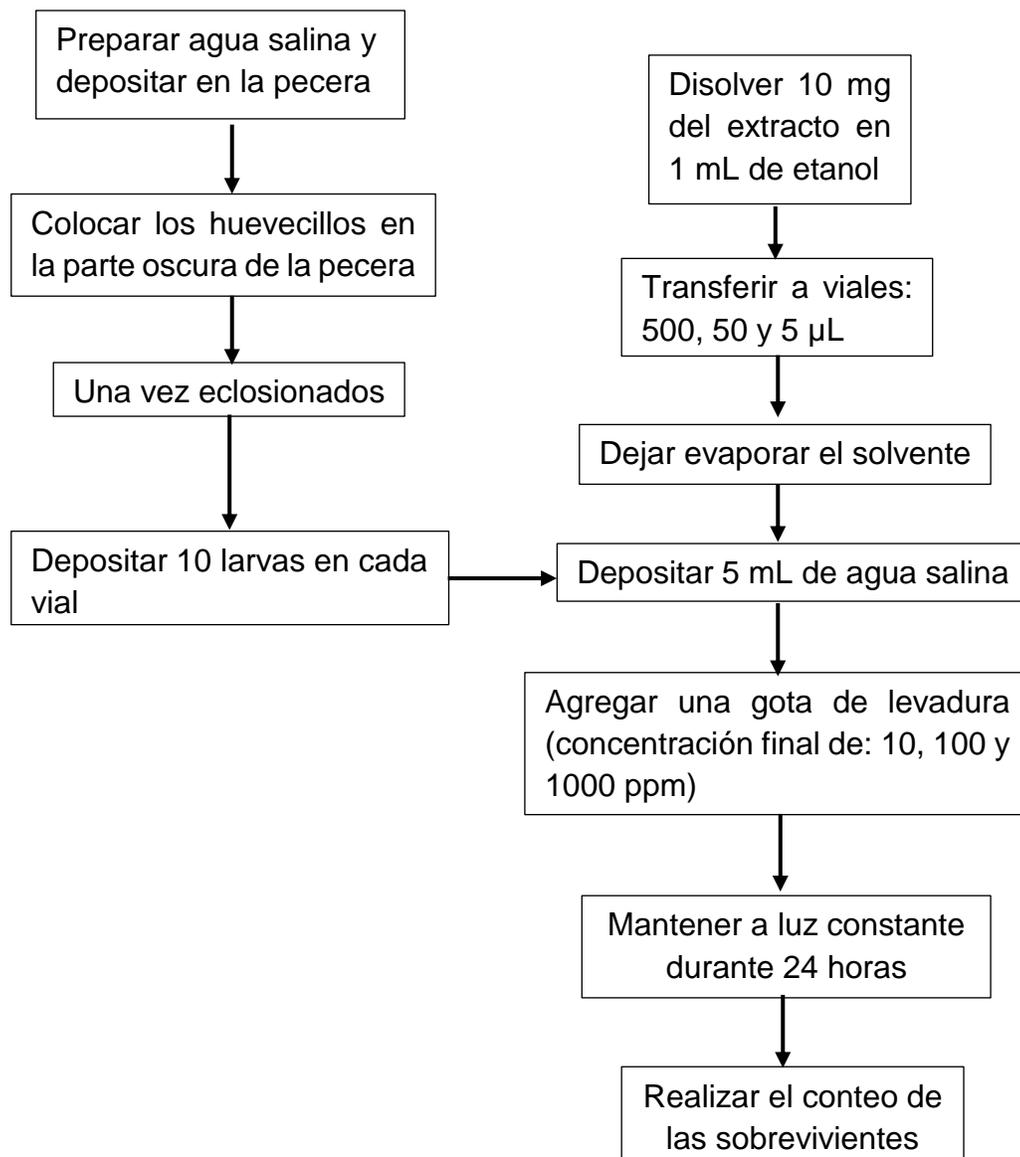


Figura 17. Evaluación de la toxicidad de los extractos sobre *Artemia salina*.

6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion. 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 utilizará la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) con un 95% de confianza.

La evaluación de los resultados de la prueba de toxicidad se realizó con el programa PROBIT para obtener la concentración letal media (CL₅₀).

VII. RESULTADOS

Se depositó dos ejemplares de herbario de los helechos *G. stolzeana* y *A. amplum*, en el herbario Eizi Matuda del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH, registrados con los números 47132 y 47134 respectivamente.

7.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

Los extractos se obtuvieron por maceración en frío de frondas y rizomas+raíces deshidratados. De cada una de las dos especies estudiadas se elaboraron ocho diferentes extractos a partir de frondas y rizomas+raíces con: hexano, acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) y acuoso. En total se investigaron 16 extractos.

7.1.1. *Goniopteris stolzeana*

De los ocho extractos obtenidos de las dos estructuras botánicas de la especie *G. stolzeana*, los extractos de mayor rendimiento fueron los metanólicos de frondas y rizomas+raíces con 11.90 g y 10.64 g respectivamente.

Las cantidades de los extractos de hexano (2.10 g) y AcOEt de frondas (2.34 g) fueron mayores que la de los extractos de rizomas+raíces, con 1.41 g (hexano) y 1.40 g (AcOEt), mientras que el extracto acuoso de frondas fue el de menor rendimiento con 1.23 g (Figura 18, Anexo 1).

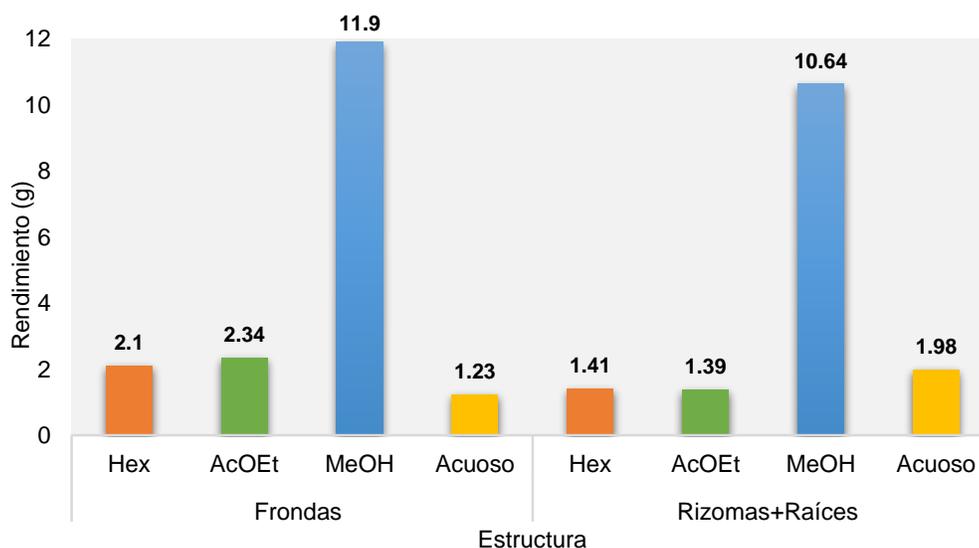


Figura 18. Rendimiento de los extractos obtenidos de *Goniopteris stolzeana*.

7.1.2. *Adiantum amplum*

En el caso de *A. amplum*, al igual que en *G. stolzeana*, el extracto de MeOH de frondas y rizomas+raíces fueron los de mayor rendimiento con valores de 11.38 g y 10.15 g cada uno, seguidos por el acuoso de frondas (4.99 g) y de los de acetato de etilo de la misma estructura con 4.39 g, y el hexánico con la menor cantidad. Los de rizomas+raíces obtenido con agua, hexano y acetato presentaron diferentes cantidades de sólidos (Figura 19, Anexo 1).

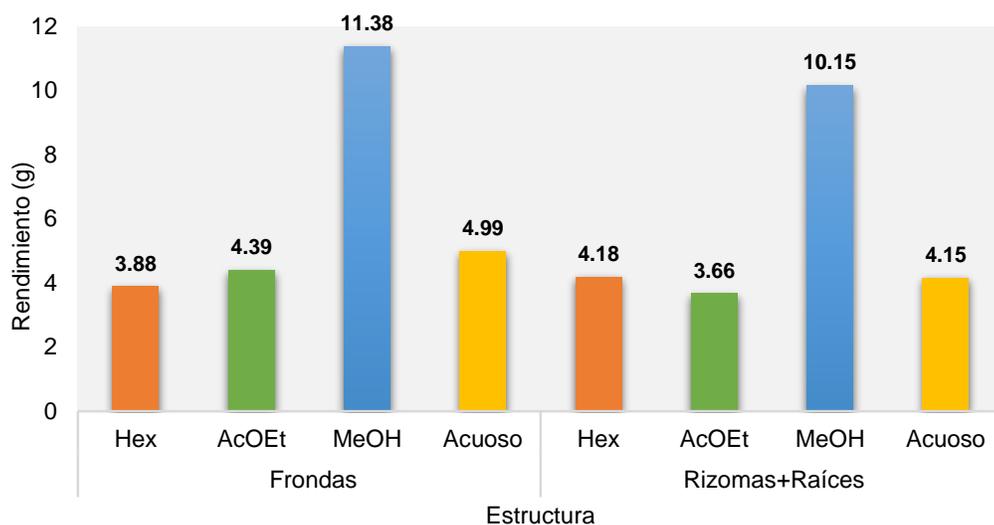


Figura 19. Rendimiento de los extractos obtenidos de *Adiantum amplum*.

En general, los ocho extractos de frondas y rizomas+raíces del helecho *A. amplum* fueron los que tienen mayor cantidad de sólidos, ya que son los que mayor rendimiento, mientras que los de *G. stolzeana* fueron los de menor rendimiento.

7.2. GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LOS EXTRACTOS

La presencia de los grupos de metabolitos secundarios (MS) en los extractos obtenidos en frío con hexano, acetato de etilo, metanol y agua de las dos especies de helechos estudiadas, es positivo, ya que se observó la presencia de uno o más grupos en los diferentes extractos.

7.2.1. *Goniopteris stolzeana*

En este helecho fueron ocho grupos los identificados: alcaloides, fenoles, flavonoides (flavona), glucósidos, saponinas, taninos (condensados e hidrolizables), terpenos y lactonas sesquiterpénicas; variando de acuerdo a la estructura vegetal y tipo de disolvente usado (Cuadro 2, Anexo 2 y 3).

Cuadro 2. Grupos de metabolitos secundarios presentes en *Goniopteris stolzeana*.

		Frondas				Rizomas+Raíces			
		Hexano	Acetato	Metanol	Acuoso	Hexano	Acetato	Metanol	Acuoso
	Alcaloides	+	-	+	-	++	++	-	-
	Fenoles	-	-	+	-	-	-	+	-
Flavonoides	Flavona	-	-	-	-	++	++	+	-
	Flavonona	-	-	-	-	-	-	-	-
	Flavonol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Xantinas	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glucósidos	+	+	-	-	+	+	-	+
	Saponinas	-	-	+	+	-	-	+	+
Taninos	Hidrolizables	-	-	-	-	+	+	-	-
	Condensados	-	-	-	+	-	-	++	-
	Esteroides	-	-	-	-	-	-	-	-
	Terpenos	-	+	-	-	-	-	-	-
	Lactonas sesquiterpénicas	++	-	-	-	-	+++	++	-

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

Extractos de frondas

En estas se identificaron siete grupos de MS: alcaloides, fenoles, glucósidos, saponinas, taninos condensados, terpenos y lactonas sesquiterpénicas. Los alcaloides en el extracto de hexano y metanol, los fenoles en el extracto metanólico, los glucósidos en el hexánico y de acetato de etilo, las saponinas en el de metanol y acuoso, los taninos condensados solo en el acuoso, al igual que los terpenos únicamente en acetato, todos en baja intensidad, solo las lactonas sesquiterpénicas presentan intensidad media solo en el hexánico (Figura 20, Anexo 2).

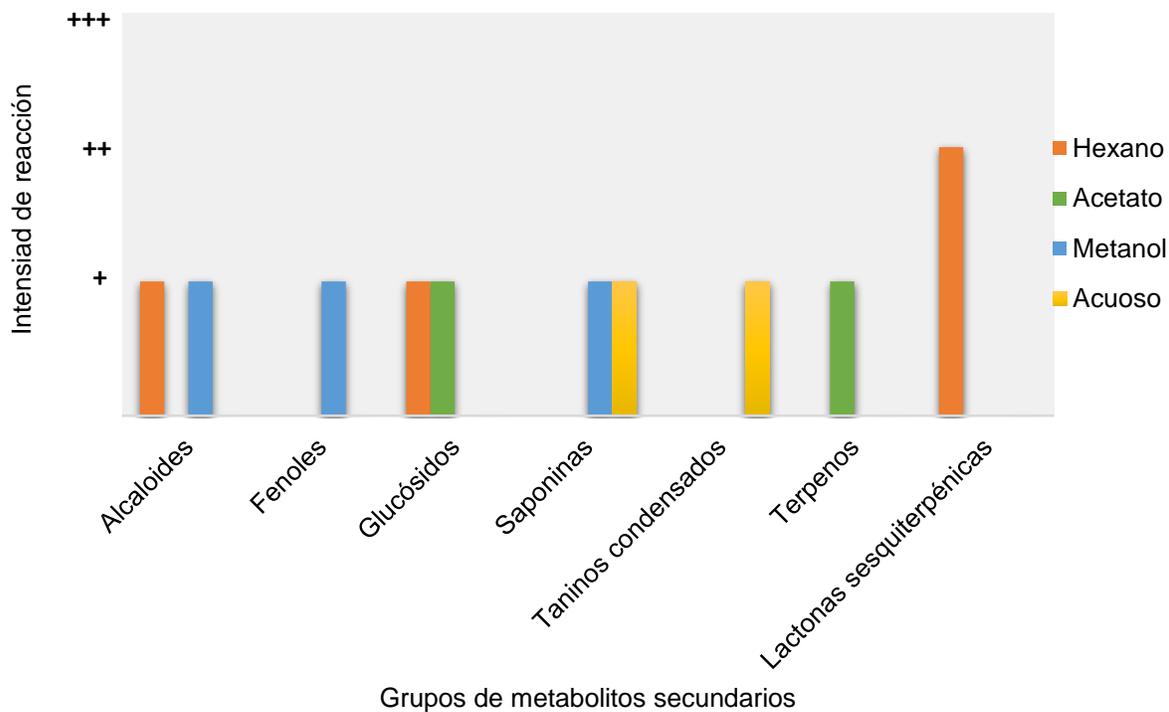


Figura 20. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de frondas de *Goniopteris stolzeana*. Intensidad de reacción: +, baja; ++, media; +++, alta.

Extractos de rizomas+raíces

Los extractos presentaron mayor diversidad de MS y en intensidad variable: en intensidad baja fenoles, glucósidos, saponinas, taninos hidrolizables; alcaloides, flavonas, taninos condensados en intensidad moderada (++) , y sólo las lactonas sesquiterpénicas en alta intensidad (+++).

En tres extractos, hexano, acetato de etilo y metanol la flavona estuvo presente, al igual que los glucósidos en el de hexano, de acetato de etilo y acuoso, siendo los de mayor presencia, seguido por los alcaloides y taninos hidrolizables en hexano y acetato, y lactonas sesquiterpénicas en acetato y metanol, únicamente se observaron fenoles, saponinas y taninos condensados en metanol (Figura 21, Anexo 3).

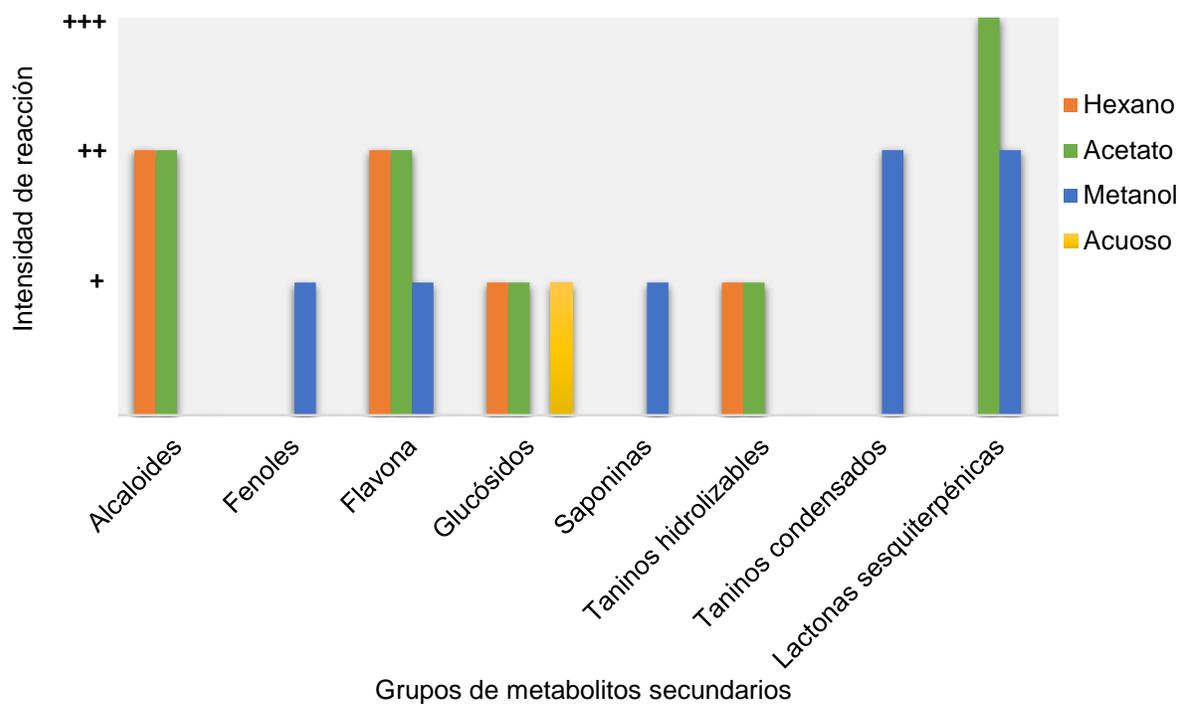


Figura 21. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de rizomas+raíces de *Goniopteris stolzeana*. Intensidad de reacción: +, baja; ++, media; +++, alta.

7.2.2. *Adiantum amplum*

Aunque hubo variaciones en la presencia de grupos de metabolitos secundarios, se identificaron de manera general siete grupos: alcaloides, fenoles, flavona, glucósidos, saponinas, taninos condensados y esteroides (Cuadro 3, Anexo 4 y 5). Los extractos con mayor número de MS fueron los metanólicos y el acuoso de frondas, cuatro en común excepto fenoles en el primero y glucósidos en el segundo.

Cuadro 3. Grupos de metabolitos secundarios presentes en *Adiantum amplum*.

		Frondas				Rizomas+Raíces			
		Hexano	Acetato	Metanol	Acuoso	Hexano	Acetato	Metanol	Acuoso
	Alcaloides	-	-	+	+	-	+	-	-
	Fenoles	-	+	+	-	-	+	+	-
Flavonoides	Flavona	-	-	+	+	+	++	-	+
	Flavonona	-	-	-	-	-	-	-	-
	Flavonol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Xantinas	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glucósidos	-	-	-	+	+	+	-	+
	Saponinas	-	-	+	+	-	-	-	+
Taninos	Hidrolizables	-	-	-	-	-	-	-	-
	Condensados	-	-	++	+	-	-	+	+
	Esteroides	+	+++	-	-	-	-	-	-
	Terpenos	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lactonas sesquiterpénicas	-	-	-	-	-	-	-	-

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

Extractos de frondas

Se identificaron siete grupos: alcaloides, fenoles, flavonoides de tipo flavona, glucósidos, saponinas, taninos condensados y esteroides, de éstos el extracto hexánico únicamente presentó esteroides en intensidad baja, seguido de acetato donde se encontró fenoles y esteroides siendo este último es el único que tuvo intensidad alta de todos los identificados, en los otros dos disolventes se identificó cinco grupos, en metanol: alcaloides, fenoles, flavona, saponinas y taninos condensados, y en el extracto acuoso: alcaloides, flavona, glucósidos, saponinas y taninos condensados, todos ellos en la menor intensidad (Figura 22, Anexo 4).

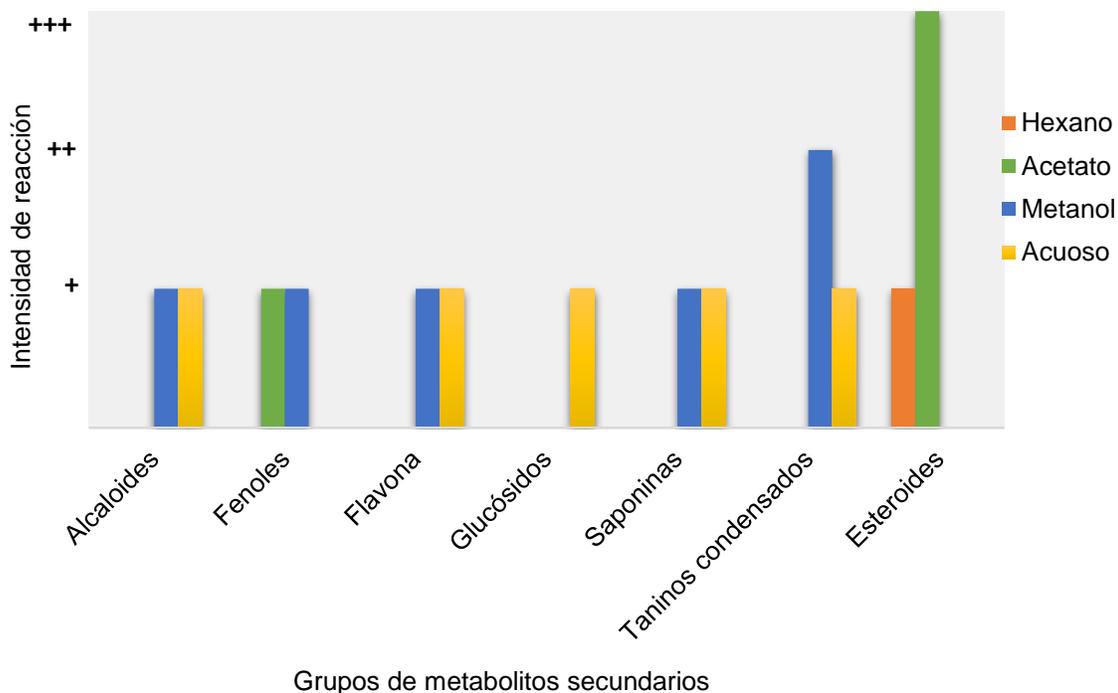


Figura 22. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de frondas de *Adiantum amplum*. Intensidad de reacción: +, baja; ++, media; +++, alta.

Extractos de rizomas+raíces

Se encontraron seis grupos de MS en los cuatro extractos de esta estructura: alcaloides, fenoles, flavona, glucósidos, saponinas y taninos condensados. Los alcaloides y saponinas sólo estuvieron presentes en los extractos de mediana y mayor polaridad, alcaloides en el de acetato y saponinas en el acuoso; los fenoles estuvieron presentes en acetato y metanol, y los taninos condensados en metanol y acuoso; los glucósidos y flavonas se comparten en hexano, acuoso y acetato, en este último las flavonas tiene una intensidad media, siendo el único grupo de MS con esta intensidad, pues todos los demás grupos de MS en los demás extractos están en intensidad baja (Figura 23, Anexo 5).

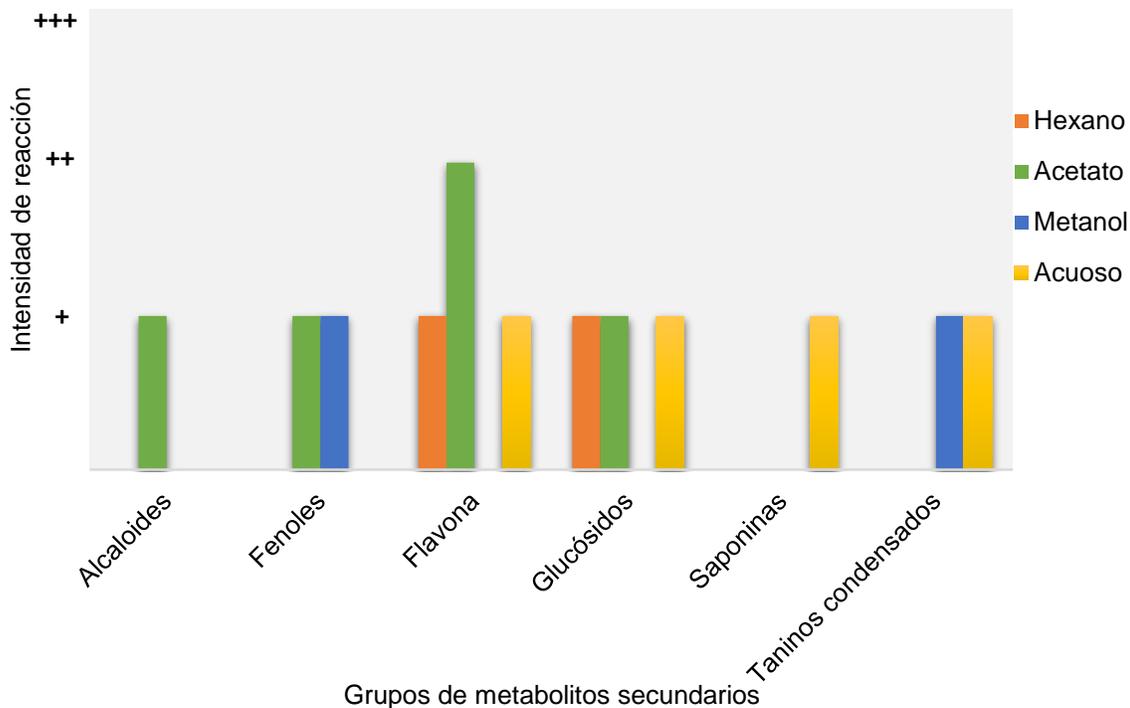


Figura 23. Presencia e intensidad de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de rizomas+raíces de *Adiantum amplum*. Intensidad de reacción: +, baja; ++, media; +++, alta.

La diversidad de los extractos de los dos helechos en cuanto a los MS presentes depende no solo del género, sino del tipo de disolvente empleado para obtenerlos.

7.3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

El efecto de los extractos de las dos especies de helechos sobre tres bacterias Gram positivas y seis especies Gram negativas corresponde a los valores de la CIM obtenidos frente a todas las cepas bacterianas, dicho valor se considera como la mínima concentración de extracto necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano.

7.3.1. *Goniopteris stolzeana*

De las Gram positivas solo *B. subtilis* no creció en presencia de los extractos de acetato de etilo y de metanol de frondas y rizomas+raíces. Los de metanol de ambas estructuras inhibieron a *S. aureus* y *S. Typhi* con la mayor concentración y a *S. epidermidis* con 20 mg/mL. El extracto de acetato de etilo del rizomas+raíces no permitió que crecieran en la concentración de 40 mg/mL *S. aureus*, *S. epidermidis* y las Gram negativas *E. coli* y *S. sonnei*; mientras que el de frondas con acetato fue

activo con la misma concentración frente a *S. sonnei* (Cuadro 4). Los extractos hexánicos fueron inactivos (Anexo 6 y 7).

Cuadro 4. Valores de CIM producidos por extractos de *Goniopteris stolzeana*.

Bacteria/ Extracto		Frondas		Rizomas+Raíces	
		AcOEt mg/mL	MeOH mg/mL	AcOEt mg/mL	MeOH mg/mL
Gram +	<i>S. aureus</i>	-	40	40	40
	<i>S. epidermidis</i>	40	20	40	40
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-
Gram -	<i>E. coli</i>	-	-	40	-
	<i>E. coli</i> enteropatógena	-	-	-	-
	<i>S. sonnei</i>	40	-	40	-
	<i>S. Typhi</i>	-	40	-	40
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-

No hubo diferencia significativa ($P= 0.6164$) en la actividad inhibitoria entre los extractos (Anexo 10), mientras que las bacterias que fueron inhibidas por más extractos fueron *S. epidermidis* y *S. aureus*.

7.3.2. *Adiantum amplum*

A diferencia de lo observado con *G. stolzeana*, los extractos de acetato de etilo de ambas estructuras despliegan su efecto inhibitorio sobre todas las bacterias, mientras que el de metanol de rizomas+raíces fue inactivo al igual que los de hexano. En ambas estructuras 10 mg/mL fue el valor de CIM más bajo, en el caso de los extractos de frondas sobre *B. subtilis*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, y en el caso del rizomas+raíces a *S. aureus*, *S. sonnei* y *S. Typhi* (Cuadro 2, Anexo 8 y 9).

La concentración de 20 mg/mL de frondas no permitió el crecimiento de las dos cepas de *Staphylococcus* y de las Gram negativas *E. coli* y *S. Typhi*, mientras que el rizomas+raíces con la concentración mencionada solo inhibió a *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. El efecto de la mayor concentración evaluada (40 mg/mL) del extracto metanólico de frondas es sólo sobre las Gram positivas *S. epidermidis* y *B. subtilis*, en el caso del de acetato de etilo de frondas con la concentración señalada, impidió el

crecimiento de *E. coli* enteropatógena y el de rizomas+raíces a *S. epidermidis* y a tres Gram negativas (Cuadro 5, Anexos 8 y 9).

Cuadro 5. Valores de CIM producidos por extractos de *Adiantum amplum*.

Bacteria/Extracto		Frondas		Rizomas+Raíces
		AcOEt mg/mL	MeOH mg/mL	AcOEt mg/mL
Gram +	<i>S. aureus</i>	20	-	10
	<i>S. epidermidis</i>	20	40	40
	<i>B. subtilis</i>	10	40	20
Gram -	<i>E. coli</i>	20	-	40
	<i>E. coli</i> enteropatógena	40	-	40
	<i>S. sonnei</i>	10	-	10
	<i>S. Typhi</i>	20	-	10
	<i>P. aeruginosa</i>	10	-	20
	<i>K. pneumoniae</i>	10	-	40

De acuerdo a los resultados obtenidos los extractos de mediana polaridad de frondas y rizomas+raíces son los que desplegaron mayor actividad ($P=0.0001$), ya que no permitieron el crecimiento de todas las bacterias ensayadas (Anexo 11), siendo *B. subtilis* y *S. sonnei* las bacteria inhibidas por los tres extractos.

7.4. TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS SOBRE *Artemia salina*

El bioensayo de toxicidad permite determinar la concentración letal media (CL_{50}) producida por los 16 extractos analizados con un nivel de confianza del 95%. Los rangos de toxicidad se consideraron de acuerdo a las categorías reportadas por Fernández-Calienes *et al.* (2009): menor a 10 $\mu\text{g/mL}$ extremadamente tóxico, entre 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ muy tóxico, de 100 a 1 000 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente tóxico y mayor a 1 000 $\mu\text{g/mL}$ no tóxico. En general, los extractos de los dos helechos fueron de moderadamente tóxicos a no tóxicos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Concentración letal media de los extractos.

Estructura	Disolvente	CL ₅₀ (µg/mL)		Categoría de toxicidad
		<i>Goniopteris stolzeana</i>	<i>Adiantum amplum</i>	
Frondas	Hex	1012.13		No tóxico
			645.26	Moderadamente tóxico
	AcOEt	939.01	214.59	Moderadamente tóxico
	MeOH	1826.47	1412.72	No tóxico
	Acuoso	1543.62	1967.34	No tóxico
Rizomas+Raíces	Hex	203.75	177.57	Moderadamente tóxico
	AcOEt	487.21	165.57	Moderadamente tóxico
	MeOH	1940.62	1365.85	No tóxico
	Acuoso	2044.57	1047.26	No tóxico

7.4.1. *Goniopteris stolzeana*

El extracto de frondas hexánico (CL₅₀ de 1 012.13 µg/mL), el metanólico y acuoso resultaron no tóxicos, con una CL₅₀ de 1 826.47 µg/mL y 1 543.62 µg/mL, al igual que los de rizomas+raíces metanólicos y acuoso con 1 940.62 µg/mL y 2 044.57 µg/mL respectivamente, mientras que acetato de frondas y, hexano y acetato de rizomas+raíces fueron moderadamente tóxicos (Cuadro 6, Anexo 12).

7.4.2. *Adiantum amplum*

Los extractos metanólicos y acuosos de ambas estructuras no fueron tóxicos al igual que los del otro helecho estudiado, los primeros con una CL₅₀ de 1 412.72 µg/mL producida por frondas y los de rizomas+raíces con el mismo disolvente con CL₅₀ de 1 365.85 µg/mL. Los acuosos con valores de 1 967.34 µg/mL (frondas) y 1 047.26 µg/mL (rizomas+raíces), los extractos de hexano y acetato de etilo fueron moderadamente tóxicos (Cuadro 6, Anexo 12).

7.5. METABOLITOS SECUNDARIOS VS. BACTERIAS INHIBIDAS

Las gráficas siguientes relacionan los metabolitos secundarios presentes y la actividad antimicrobiana que presentan los extractos. Las bacterias más sensibles a este

helecho fueron las Gram positivas *S. epidermidis* inhibida por cuatro extractos, los de mediana y mayor polaridad, con los glucósidos en común en los de AcOEt y en los de MeOH fenoles y saponinas, y *S. aureus* por tres, el de acetato de etilo de rizomas+raíces con cinco tipos de productos naturales y los metanólicos de frondas y rizomas+raíces, con MS en común como son fenoles y saponinas (Figura 24).

Las frondas y las rizomas+raíces en metanol inhibieron a *S. Typhi* que tienen en común a fenoles y saponinas, mientras que los de acetato de etilo no permitieron el crecimiento de *S. sonnei* y solo el de AcOEt presenta efecto en *E. coli* (Figura 24).

Los extractos de *G. stolzeana* de frondas y rizomas+raíces de hexano y acuoso fueron inactivos sobre las cepas probadas y solo el grupo de glucósidos común en tres de los cuatro, excepto en el acuoso de frondas (Figura 24).

De los extractos de rizomas+raíces, el acuoso fue el que presentó solo un grupo de MS: glucósidos, mientras que hexano presentó cuatro grupos; siendo los extractos de acetato y metanol los que presentaron cinco grupos, compartiendo flavonas y lactonas sesquiterpénicas, e inhibieron a cuatro y tres cepas respectivamente, pero ambos inhibieron a *S. epidermidis* y *S. aureus* (Figura 24).

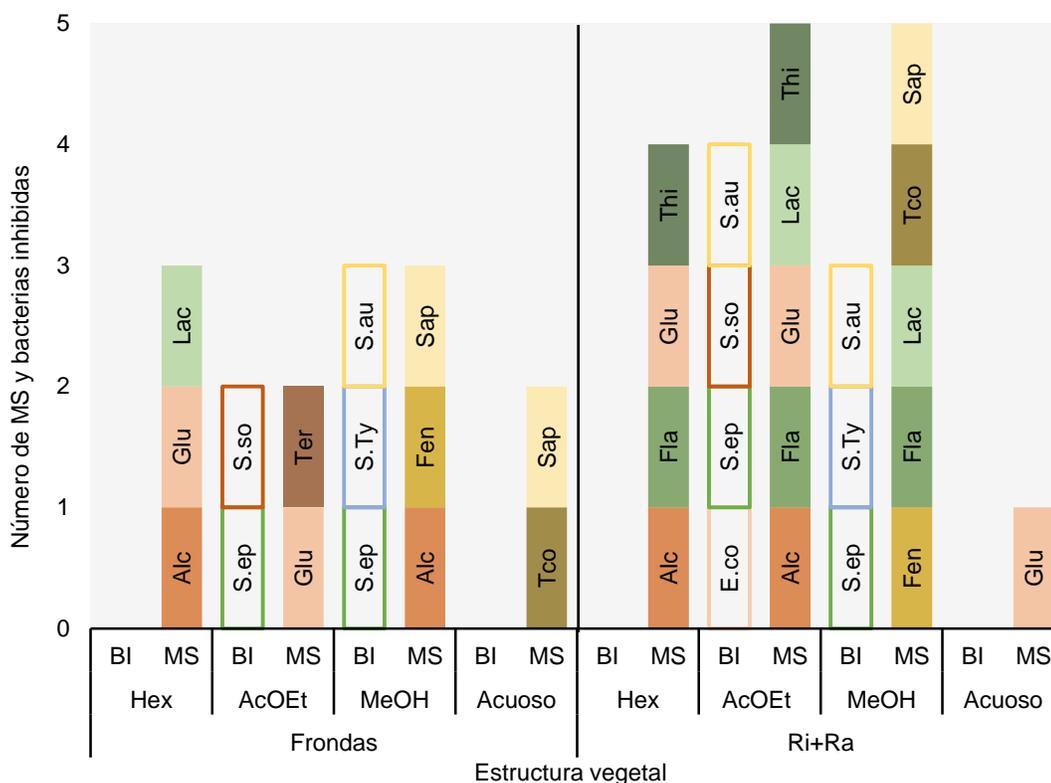


Figura 24. Inhibición de bacterias y metabolitos secundarios presentes en extractos de *G. stolzeana*. BI: bacterias inhibidas; MS: metabolitos secundarios; S.au: *S. aureus*; S.ep: *S. epidermidis*; E.co: *E. coli*; S.so: *S. sonnei*; S.Ty: *S. Typhi*; Alc: alcaloides; Fen: fenoles; Fla: flavona; Glu: glucósidos; Sap: saponinas; Thi: taninos hidrolizables; Tco: taninos condensados; Ter: terpenos; Lac: lactonas sesquiterpénicas.

En la especie *A. amplum* los extractos de frondas de acetato de etilo con fenoles y esteroides no permitieron el crecimiento de las nueve cepas bacterianas ensayadas, al igual que el de rizomas+raíces pero este último con presencia de alcaloides, flavona, glucósidos y fenoles, sólo éste último en común en ambos extractos. El metanólico de frondas con alcaloides, fenoles, flavonas, taninos condensados y saponinas inhibieron a *S. epidermidis* y *Bacillus subtilis* ambas Gram positivas. El metanólico de rizomas+raíces con fenoles y taninos condensados no tuvo efecto (Figura 25).

Los dos extractos de hexano (con diferentes MS) y los acuosos de frondas (con cinco MS) y de rizomas+raíces (tiene cuatro MS) y ambos con flavonas, glucósidos, taninos condensados y saponinas en común, únicamente el de frondas con presencia de alcaloides. Los cuatro tuvieron en común el nulo efecto inhibitorio sobre las tres bacterias Gram positivas y las seis Gram negativas (Figura 25).

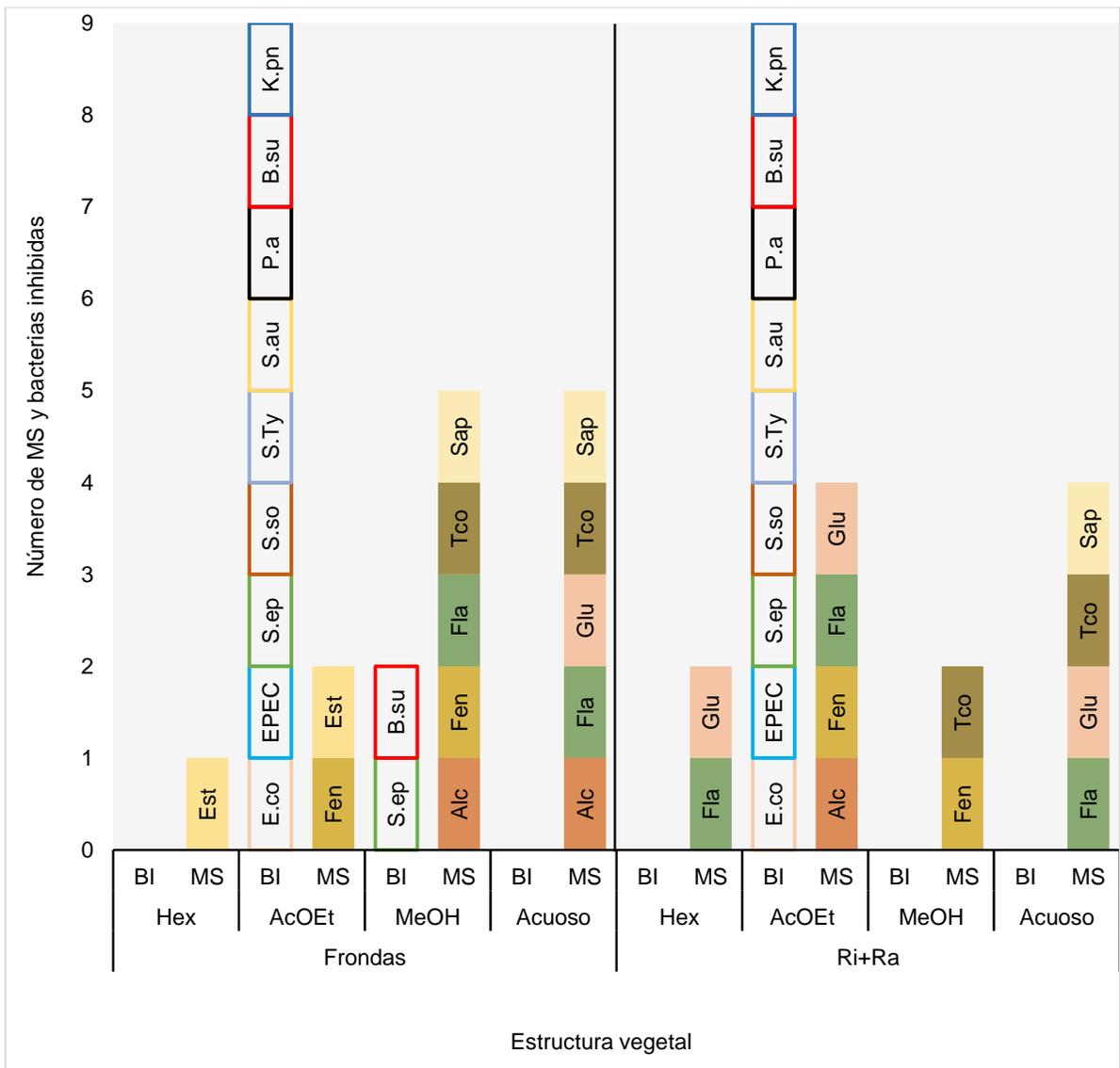


Figura 25. Inhibición de bacteriana y metabolitos secundarios presentes en extractos de *A. amplum*. BI: bacterias inhibidas; MS: metabolitos secundarios; S.au: *S. aureus*; S.ep: *S. epidermidis*; B. su: *B. subtilis*; E. co: *E. coli*; EPEC: *E. coli* enteropatógena; S. so: *S. sonnei*; S. Ty: *S. Typhi*; P. a: *P. aeruginosa*; K. pn: *K. pneumoniae*; Alc: alcaloides; Fen: fenoles; Fla: flavona; Glu: glucósidos; Sap: saponinas; Thi: taninos hidrolizables; Tco: taninos condensados; Est: esteroides; Ter: terpenos; Lac: lactonas sesquiterpénicas.

VIII. DISCUSIÓN

A partir de las últimas décadas del siglo pasado existe un creciente interés en el estudio de las plantas como fuente de medicamentos, ya que éstas tienen compuestos químicos llamados también metabolitos secundarios, que les confieren usos terapéuticos desde hace siglos. Entre las plantas medicinales más usadas están las angiospermas que producen flores, pero existe otro grupo muy antiguo y menos estudiado, el de las pteridofitas donde se encuentran los helechos, empleados también en la medicina tradicional para tratar diferentes padecimientos en diversos países del mundo incluyendo México, usados en infusión o aplicados de manera externa (Muñiz Díaz de-León *et al.*, 2005; Muhammad *et al.*, 2020), por tal motivo actualmente los helechos se han convertido en el objeto de estudio de diversos investigadores, sobre todo en relación a sus compuestos químicos, y su actividad biológica, siendo un recurso amplio para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos para uso farmacológico (Winter y Amoroso, 2003).

Cómo se señaló en los antecedentes de las dos especies investigadas no se han encontrado hasta hoy reportes acerca de *A. amplum* y *G. stolzeana*.

En total, de las dos especies, se obtuvieron dieciséis extractos, de ellos, doce por maceración en frío con disolventes orgánicos de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol) y cuatro acuosos por decocción. En general, de los dos helechos investigados *G. stolzeana* es el que tiene mayor cantidad de sólidos en los extractos, los metanólicos con 11.90 g (frondas) y 10.64 g (rizomas+raíces), y para *A. amplum* 11.38 g (frondas) y 10.15 g (rizomas+raíces), seguidos de los de acetato de etilo, hexano y acuoso (Figura 18 y 19), siendo este último la forma más usada en la medicina tradicional. El mayor rendimiento de los extractos metanólicos coincide con el reportado por Muhammad *et al.* (2014), para los extractos metanólicos de *A. caillus-veneris* de hojas (35 %) y tallos (20 %), los que tuvieron mayor rendimiento.

Con relación a la diferencia de peso entre los extractos elaborados coincide con lo reportado por Paiva *et al.* (2010) quienes mencionan que extractos del mismo material vegetal obtenidos con disolventes de polaridad diferente poseen diversas

cantidades y tipos de MS en intensidad diversa (Cuadros 2 y 3), lo que posiblemente indiquen actividades biológicas diferentes. También, la diferencia en el rendimiento puede deberse a factores como la temperatura, la forma y tiempo de extracción (Truong *et al.*, 2019).

En los grupos de MS identificados en los extractos de ambos helechos, se advierte diversidad en los extractos de cada estructura, así como en la intensidad de la reacción (Cuadros 2 y 3), lo que coincide con Camacho-Escobar *et al.*, 2020; Anaya Lang (2003) y Vargas-Alvarez *et al.* (2006), al señalar que esto puede explicarse porque la biosíntesis de los mismos es determinada por factores genéticos, químicos y factores físicos-ambientales, al igual que la acumulación es órgano-específica.

Los grupos de MS identificados en frondas en *G. stolzeana* corresponden a siete grupos: alcaloides, fenoles, glucósidos, saponinas, taninos condensados, terpenos, todos con intensidad de reacción baja (+), y lactonas sesquiterpénicas con intensidad de reacción media (++), con relación a los grupos de MS identificados al no existir reportes del género se compara con géneros de la misma familia, Pereira y Antunes (2012) coinciden con dos grupos de MS en *Thelypteris dentata*, en el que únicamente se identificaron taninos y saponinas. Los MS identificados en rizomas+raíces corresponden a siete grupos: fenoles, glucósidos, saponinas, y taninos hidrolizables, con intensidad baja (+), alcaloides, flavona y taninos condensados con intensidad media (++) y lactonas sesquiterpénicas con intensidad alta (Cuadro 2).

En *A. amplum*, en las frondas se encontraron: alcaloides, fenoles, flavonoides tipo flavona, glucósidos y saponinas en baja intensidad de reacción, taninos condensados en intensidad media y esteroides en intensidad alta (+++), aunque no hay presencia de terpenos y lactonas sesquiterpénicas (Cuadro 3); en rizomas-raíces se identificaron seis grupos: alcaloides, fenoles, glucósidos, saponinas y taninos condensados en baja intensidad de reacción, flavonas en intensidad alta (+++), aunque no hay presencia de terpenos, lactonas sesquiterpénicas y esteroides (Cuadro 2), éstos resultados coinciden con los encontrados por Muhammad *et al.* (2014) ya que en sus extractos encontraron los mismos grupos de MS en *A. capillus-veneris*, aunque en hojas ellos si identificaron terpenoides, y en sus extractos de tallos y raíces

encontraron terpenos y esteroides, los cuales no se identificaron en el extracto de rizomas-raíces en esta investigación.

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante la CIM, donde los resultados mostraron que los extractos bioactivos de ambos helechos fueron los de acetato de etilo y el metanólico, aunque los MS y el número de bacterias son diferentes.

Los resultados mostraron que la mayor actividad antibacteriana la ejercieron los extractos de *A. amplum* de acetato de etilo sobre las nueve cepas bacterianas usadas en esta investigación, las frondas produjeron la CIM de 10 mg/mL siendo este el valor más bajo sobre *B. subtilis*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, y rizomas+raíces sobre *S. aureus*, *S. sonnei* y *S. Typhi*. Aunque el extracto de acetato de etilo se identificaron fenoles y esteroides, estos al parecer hacen sinergia entre ellos ya que inhibieron a todas las cepas evaluadas; cabe señalar que en el caso de rizomas+raíces se observaron cuatro MS pero en común los dos extractos tienen fenoles, los cuales de acuerdo a Abud-Blanco *et al.* (2015) tienen un alto poder bactericida.

Los extractos de acetato de etilo de frondas de *A. capillus-veneris* reportado por Muhammad *et al.* (2014), inhibieron a las mismas bacterias en este estudio, que evaluó por el método de difusión sobre: *E. coli*, *S. sonnei*, *S. Typhi*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*; sin embargo reportan que *S. aureus* no presentó inhibición, mientras que en este estudio sí (CIM=20 mg/mL.), en los extractos donde dividieron en tallos y raíces, reportaron actividad frente a: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. sonnei* y *S. Typhi*, los cuales concuerdan con lo obtenido en este estudio.

Aunque las bacterias Gram negativas presentan una cubierta externa más compleja al poseer tres capas (Molina y Eslava, 2015), el hecho de que existan CIM bajas sobre estas bacterias es importante para los fines de esta investigación, indicando que uno o varios de los MS atraviesan la triple capa bacteriana y por ello su efecto inhibitorio.

Mientras que el extracto metanólico de frondas, el único activo, inhibió solo a *S. epidermidis* y *B. subtilis* (CIM=40 mg/mL), presentando cinco grupos de MS, como son fenoles (+), saponinas (+), taninos condensados (++), alcaloides (+) y flavona (+).

Aunque existen pocos reportes sobre la actividad antimicrobiana de especies del género *Adiantum*, resultados obtenidos con el extracto metanólico difieren con lo reportado sobre *A. capillus-veneris*, *A. peruvianum*, *A. venustum* y *A. caudatum* por Singh *et al.* (2008), ya que los extractos metanólicos de los que no indica de qué estructura del helecho lo obtuvieron, inhibieron a dos Gram positivas: *S. aureus* y *B. subtilis*. Dichos resultados coinciden solo con el efecto sobre *B. subtilis*, pero no es posible contrastar el valor de la CIM, ya que los autores no indican una estructura en particular.

Los extractos de frondas y rizomas+raíces de *G. stolzeana* obtenidos con hexano y acuoso no inhibieron el crecimiento de ninguna de las bacterias evaluadas. La acción inhibitoria fue presentada por los extractos de acetato y metanol de ambas estructuras, siendo el extracto de AcOEt con los MS glucósidos, taninos hidrolizables (+), alcaloides, flavona (++) y lactonas sesquiterpénicas (+++) de rizomas+raíces el de mayor efecto sobre las Gram positivas *S. aureus* y *S. epidermidis* y las Gram negativas *E. coli* y *S. sonnei*, mientras que el de frondas inhibió a *S. epidermidis* y *S. sonnei* con glucósidos y terpenos (+); seguido de los extractos metanólicos, que inhibieron a *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. Typhi*, que aunque difieren en el número de grupos MS, comparten: fenoles (+) y saponinas (+).

Los resultados de las MIC nos muestran que los extractos más activos fueron los de acetato de etilo de *A. amplum* y los metabolitos de mayor presencia en los extractos activos fueron los fenoles, alcaloides y flavonoides tipo flavona, los cuales pudieron tener un mayor efecto sobre las bacterias; siendo las más sensibles *S. epidermidis* inhibida por los siete extractos activos y *S. aureus* inhibida por cinco.

Los fenoles, fueron el grupo que mayor presencia, pues se encontró en cinco de los siete extractos activos; en *A. amplum* estuvo presente en los extractos de AcOEt de frondas y rizomas+raíces, mismos que presentaron el mayor efecto inhibitorio, y metanólico de frondas y en *G. stolzeana* estuvieron en los extractos de MeOH; dentro de los mecanismos que pudieron ejercer el efecto inhibitorio de estos extractos, están la inhibición de enzimas, actuar como bombas de flujo reduciendo la actividad del paso de iones, actuar directamente en el peptidoglicano, inhibe la biosíntesis de la pared

celular, se puede unir a las enzimas de las bacterias a través del enlace hidrógeno induciendo así modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular y la integridad de la pared celular (Cowan, 1999; Khameneh *et al.*, 2019; Othman *et al.*, 2019; Jubair *et al.*, 2021).

En las frondas (MeOH) y rizomas+raíces (AcOEt) de ambas especies, están presentes los alcaloides, los cuales pueden actuar frente a las bacterias, afectando la división celular, inhibición respiratoria e inhibición enzimática, rotura de membrana y afección a los genes de virulencia (Othman *et al.*, 2019).

Los flavonoides tipo flavona, que se encuentran en frondas con MeOH de *A. amplum* y en rizomas+raíces con AcOEt, al igual que en *G. stolzeana* con AcOEt y MeOH, pudieron haber actuado sobre las bacterias formando complejos con proteínas extracelulares y solubles, así como con la pared celular bacteriana evitando así la adhesión (Baskaran *et al.*, 2018; Othman *et al.* 2019; Jubair *et al.*, 2021).

Los taninos de los dos tipos, que se encuentran en *G. stolzeana* en rizomas-raíces y en *A. amplum* en sus frondas (MeOH) únicamente condensados, estos extractos variaron en la cepas bacterianas inhibidas, esto es porque la diferencia en las estructuras químicas influyó en la actividad biológica de los extractos, ya que de acuerdo a Gonçalves-Alvim *et al.* (2011) la estructura química de los taninos condiciona la actividad biológica y según Cala *et al.* (2010) su afinidad por ciertas moléculas, ya que la actividad inhibitoria la ejercen al formar complejos con proteínas a través de interacciones covalentes y no covalentes. En el caso de los taninos condensados, también se ha demostrado que pueden ser capaces de unirse a las paredes celulares de las bacterias, inhibiendo el crecimiento y la actividad de las proteasas (Othman *et al.* 2019).

En *G. stolzeana* de los extractos activos, fue el único que presenta en terpenos en frondas (AcOEt), saponinas en ambas estructuras (MeOH) y lactonas en rizomas+raíces con los dos solventes antes mencionados. Los terpenos y las lactonas pueden actuar sobre las estructuras de la membrana, aumentando su fluidez y permeabilidad, provocando alteraciones a lo largo de la cadena respiratoria, también puede causar inhibición de la bomba de flujo (Chadwick *et al.* 2013; Khameneh *et al.*

2019; Jubair *et al.* 2021). Las saponinas su actividad antimicrobiana radica en que forman complejos con los esteroides de las membranas celulares y produce grandes poros que alteran su permeabilidad y la célula se lisa.

Es importante mencionar que los MS identificados en los extractos bioactivos como son los alcaloides, fenoles, flavonoides, taninos, terpenos, lactonas y saponinas se les atribuye propiedades antibacterianas (Araujo-Díaz y Salas-Asencios, 2008) por lo que la actividad pudo ser por la interacción entre los diferentes grupos de MS presentes.

Aunque en los extractos exista una gran diversidad de tipos de MS, esto no siempre se ve reflejado en el efecto antimicrobiano, como se observa en los resultados de esta investigación (Figura 24 y 25). Por ello podríamos inferir que el principio activo se encuentre en una o varias de las moléculas de los grupos antes mencionado, las cuales pueden estar actuando de manera separada o en conjunto (Dufourc, 2008; Burčová *et al.*, 2018). Aunado a esto, Neu (1992) menciona que los extractos no se encuentran puros, sino que son mezclas complejas de MS que se encuentran en interacción, como sinergismo, adición, competencia y antagonismo, lo que interviene en su actividad biológica, por lo cual es posible explicar porque unos extractos inhibieron ciertas bacterias y otros no.

Como ya se vio, aunque los extractos contiene metabolitos secundarios con actividades biológicas importantes como la actividad antimicrobiana, también existen moléculas que pueden afectar la salud humana, haciéndolas muchas veces tóxicas. Nuestros resultados presentaron una gran similitud entre las dos especies (Cuadro 6), donde los extractos metanólicos y acuosos de ambas especies no son tóxicos, esto según la categoría propuesta por Fernández-Calienes *et al.* (2009), aunque la toxicidad depende de la dosis, por consiguiente, la concentración a la que el producto activo se encuentra en el lugar del receptor (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009), según Ríos *et al.* (2012) las variaciones climáticas, la época del año, la parte utilizada de la planta, son factores que afectan la cantidad y diferencia de moléculas tóxicas. Los grupos reportados como tóxicos según, Granados-Sánchez *et al.* (2008), son algunos nitratos, alcaloides, saponinas y taninos, los cuales pueden provocar la inhibición de

la síntesis de DNA y RNA, inhiben la mitosis y afectan la función de las membranas. Que los extractos empleados no sean tóxicos da pauta para continuar estudiando la actividad biológica, según Martínez-Echeverría *et al.* (2017) la baja toxicidad en los extractos los hace una alternativa para la obtención de nuevos fármacos.

IX. CONCLUSIONES



Los mayores rendimientos obtenidos corresponden a los extractos metanólicos en ambas especies.



Las frondas y rizomas+raíces de las dos especies de helechos presentaron en común los grupos de metabolitos secundarios: alcaloides, fenoles, saponinas, taninos condensados y glucósidos.



La especie *G. stolzeana* fue el único que presentó terpenos en frondas, taninos hidrolizables en rizomas+raíces y lactonas sesquiterpénicas en ambas estructuras. Y los esteroides solo estuvieron presentes en frondas de *A. amplum*.



Los extractos más activos fueron los de acetato de etilo de frondas y rizomas+raíces de *A. amplum* al inhibir a todas las bacteriana evaluadas.



Los microorganismos más sensibles fueron dos Gram positivas: *S. epidermidis* y *S. aureus* y, las más resistentes fueron *E. coli* enteropatógena, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.



Las CIM más bajas (10 mg/mL) fueron producidas por *A. amplum* con el extracto de acetato de etilo sobre la Gram positiva *B. subtilis* y Gram negativas *S. sonnei*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* con frondas y *S. aureus*, *S. Typhi* y *S. sonnei* con rizomas+raíces. Mientras que *G. stolzeana* la CIM menor fue la del extracto metanólicos de frondas sobre la Gram positiva *S. epidermidis* (20 mg/mL).



La toxicidad de los extractos de las dos especies de helechos, va de moderada a no tóxicos.



El aporte de esta investigación es importante, debido a que este es el primer estudio realizado con estas dos especies de helechos, los cuales presentan metabolitos secundarios con actividad farmacológica, mostrando inhibición sobre bacterias patógenas para los humanos, además la toxicidad que presentan es baja, por ello, son especies que merecen ser estudiados a mayor profundidad.

X. RECOMENDACIONES



Ampliar los estudios etnopteridológicos en México para así poder realizar más estudios enfocados a los MS presentes y la actividad que puedan presentar.



Realizar otros métodos de extracción para determinar si hay diferencias en la presencia de los grupos de metabolitos secundarios.



Llevar a cabo pruebas cuantitativas sobre los metabolitos secundarios presentes en las estructuras estudiadas.



Realizar estudios sobre la actividad biológica sobre diferentes microorganismos para evaluar si los MS presentes tienen otras actividades biológicas.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Abud-Blanco, K., Bustos-Blanco, L., Covo-Morales, E. y Fang-Mercado, C. L. 2015. Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos sulfonados en el sistema de conductos radiculares. Revisión sistemática. *Ciencia y Salud Virtual*. 2 (7): 53-60.
- Acero-Montaña, A. y Marcela-Vargas, C. 2008. Estudio in vitro para determinar la afinidad de *Staphylococcus epidermidis* con materiales de lentes de contacto blandos y evaluación de la acción antimicrobiana de soluciones de mantenimiento. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T. y Iwatsuki, K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 4 (48): 487-491.
- Almeida, T. E., Hennequin, S., Schneider, H., Smith, A. R., Nogueira-Batista, J. A., Ramalho, A. J., Proite, K. y Salino, A. 2016. Towards a phylogenetic generic classification of Thelypteridaceae: additional sampling suggests alterations of Neotropical taxa and further study of paleotropical genera. *Molecular Phylogenetics and Evolutions*. (94): 688-700.
- Almeyda-Cen, A. I. 2017. Estudio de la acumulación del ácido betulínico y urechitol A durante el desarrollo de *Pentalinn andrieuxii* y su relación con la metilación de ADN. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán.
- Alonso, M., Bara, S. y Vega, J. A. 1993. Ácidos fenólicos como parámetros bioquímicos indicadores de estrés en viveros de *Pinus pinaster*. Investigación Agraria. *Sistemas y Recursos Forestales*. 2 (2): 185-196.

- Alonso-Melero, M. R. 1994. Nuevo marcador epidemiológico en *Salmonella* entérica subespecie I serotipo Enteritidis. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid, España.
- Álvarez, J. M. 2007. Tanino: La revolución enológica. Mito o realidad. *Revista Enología*. 2: 1-15.
- American Fern Society. 2021. About Ferns. <https://www.amerfernsoc.org/about-ferns>. Consultado el diciembre de 2021.
- Anaya-Lang, A. L. 2003. Ecología química. Instituto de Ecología. Plaza Valdes. México, D. F.
- Andrews, J. M. y Howe, A. R. 2011. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66: 2726-2757.
- Andueza, F., Albuja, A., Arguelles, P., Escobar, S., Espinoza, C., Aranque, J. y Medina, G. 2015. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia del Chimborazo, Ecuador. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2 (81): 158-163.
- Anónimo. 2018. Compuestos fenólicos: taninos. <https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/panorama%20documentos%20multimedia/PAM235%20PLANTAS%20MEDICINALES%20CON%20TANINOS.PDF>. Consultado el 13 de enero de 2020.
- Apaza-Tacca, L. y Gonzales-Uscamayta, M. 2015. Extracción y purificación del partenólido de la especie *Tanacetum parthenium* de la ciudad del cusco por métodos cromatográficos utilizando el acetato de etilo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.
- Araujo-Díaz, J. y Salas-Asencios, R. 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Revista Científica de la Universidad Científica del Sur*. 2 (6).

- Arias, B. I., Cáceres, R. O., Figueroa, V. M., Huguet, T. J. y Camiña, Q. M. 2004. *Escherichia coli* enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 3 (21): 176-178.
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*. 2 (3):119-145.
- Ávila-Cortés, F. J., Jácome-Galarza, I. E., Silva-Gamiño, A. R. y Silva-García, O. 2011. Identificación de los genotipos patógenos de *Escherichia coli* por PCR en tiempo real y análisis de su resistencia a los antibióticos en el estado de Michoacán, México. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 97 (25): 13-16.
- Ayuntamiento Constitucional Municipal de Villa Corzo. 2019. Diagnóstico general estadístico de la agricultura, ganadería, pesca y forestal del municipio de Villa Corzo, Chiapas, México. http://villacorzo.gob.mx/storage/files/contratos/obras/Diagn%C3%B3stico%20General%20Estad%C3%ADstico%20de%20la%20Agricultura,%20Ganaderia,%20Pesca%20y%20Forestal%20Villa%20Corzo%202019_05_14%20.pdf. Consultado el 18 de agosto de 2019.
- Baos-Muños, E. 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 de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M. y Retamal, P. 2016. *Salmonella entérica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 5 (33): 547-597.
- Baskaran, X. R., Geo Vigila, A. V., Zhag, Shou-Zhou., Feng, Shi-Xiu. y Liao, Wen-Bo. 2018. A review of the use of pteridophytes for treating human aliments. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2 (19): 85-119.

- Batlle-Almodóvar, M. C., Dickinson, F., Pérez-Monrás, M., Tamargo-Martínez, I. y Similis, A. 2005. Meningitis bacteriana y *Pseudomonas aeruginosa*: a propósito de un caso. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 3 (57). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602005000300014&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Consultado el 23 de junio de 2019.
- Benítez-Cruz, G. s.d. Farmacognosia. http://www.micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/GBenitezC/Farmacognosia03/Farmacognosia%20GB_11.pdf. Consultado el 23 de diciembre de 2021.
- Boronat, A. y Rodríguez-Concepción, M. 2015. Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. In: Shrader, J. y Bohlmann, J. (Eds.). *Biotechnology of Isoprenoids*. Springer. Sitzerland.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. y Gontier, E. 2001. Production of plants secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161: 839-851.
- Brahmachari, G., Mondal, S., Chatterjee, D. y Brahmachari, A. K. 2003. Phytochemicals and biological activities of *Adiantum* species. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 62: 1119-1130.
- Breña, E. D., Font, P. L., Busto, A. R., Castellanos, F. M. E. y Reyes, C. V. 2009. Neumonía complicada por *Stafilococcus epidermidis* en un paciente con osteomielitis del fémur. Reporte de caso. *Revista Médica Electrónica*. 3 (1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242009000100015. Consultado el 25 de junio de 2019.
- Bridle, H. 2013. Overview of Waterborne Pathogens. En: Bridle, H. *Waterborne pathogens: detection methods and applications*. Elsevier. Gran Bretaña. pp. 9-40.
- Bueno-Sánchez, J. G., Martínez-Morales, J. R., Stashenko, E. E. y Ribón, W. 2009. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica*. 1 (29): 51-60.

- Burčova, Z., Kreps, F., Greifová, M., Jablonsky, M. y Haz, A. 2018. Antibacterial and antifungal activity of phytosterols and methyl dehydroabietate of Norway spruce bark extracts. *Journal of Biotechnology*. 282: 18-24.
- Bustillo, P. A. E. 1979. Aspectos generales sobre el insecticida microbio *Bacillus thuringiensis*. *Sociedad Colombiana de Entomología "SOCOLEN"*. 3: 2-32.
- Cala, O., Pinaud, N., Simon, C., Fouquet, E., Laguerre, M., Dufourc, E. J. y Pianet, I. 2010. NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 11 (24): 4281-4290.
- Calvo, P. y Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*. 1 (9): 31-39.
- Camacho-Escobar, M. A., Ramos-Ramos, D. A., Ávila-Serrano, N. Y., Sánchez-Bernal, E. I. y López-Garrido, S. J. 2020. La defensa físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *Terra Latinoamericana*. 2 (38): 443-453.
- Cao, H., Chai, T.T., Wang, X., Morais-Braga, M. F. B., Yang, J. H., Wong, F. C., Wnag, R., Yao, H., Cao, J., Cornara, L., Burlando, B., Wang, Y., Xiao, J. y Coutinho, H. D. M. 2017. Phytochemicals from fern species: potential for medicine applications. *Phytochemistry Reviews*. 16: 379-440.
- Caputi, L. y Aprea, E. 2011. Use of terpenoids as natural flavouring compounds in food industry. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*. 3: 9-16.
- Castillo-España, P., Perea-Arnago, I., Arellano-García, J. de J. y Valencia-Díaz, S. 2019. Qué son y para qué sirven los metabolitos de las plantas. *Ciencia y Desarrollo*. <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=227>.
- Castillo-Olivera, G., Zavala Cuevas, D. y Carrillo Inungaray, M. L. 2017. Análisis fitoquímico: una herramienta para evaluar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *TLATEOMANI Revista Académica de Investigación*. 24: 71-86.

- Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrp, F. y Wagstaff, C. 2013. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*. 6 (14): 12780-12805.
- Chávez-Bravo, E., Martínez Gómez, L. E., Cedillo Ramírez, M .L., Gil Juárez, C., Avelino Flores, F. y Castañeda Roldán, E. I. 2007. Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 3 (27): 70-74.
- Chung The, H., Rabaa, M. A., Thanh, P. D., Ruekit, S., Wangchuk, S., Dorji, T., Pem, T. K., Thi Nguyen, T. N., Voog, V. P., Ha, T. T., Ngoc Minh. C. N., Turner, P., Thwaites, G., Holt, K. E., Thomson, N. R., Bodhidatta, L., Jeffries Mason, C. y Baker, S. 2015. Introduction and establishment of fluoroquinolone-resistant *Shigella sonnei* into Bhutan. *Microbial Genomics*. 1 (6): 1-11.
- Cisterna-Cáncer, R. y Madariaga-Torres, L. 1986. Patogenia de la infección por *Staphylococcus aureus*. <https://esteven.org/wp-content/uploads/2018/01/136593.pdf>. Consultado el 27 de junio de 2019.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). s.d. Plan de seguridad del sistema de abastecimiento de agua para la cabecera municipal de Villa Corzo, Chiapas, México. http://saludchiapas.gob.mx/doc/planagua/psa_119.pdf Consultado el 18 de agosto de 2019.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2009. Helechos, cola de caballo o carricillo, doradilla (Pteridophyta). <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/pdf/GranFamilia/Plantas/helechos.pdf>. Consultado el 27 de agosto de 2019.
- Cona, T. E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 2 (19): 77-81.
- Cowan, M. K. 2012. Microbiology a systems approach. Editorial McGraw-Hill. Nueva York. USA.

- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582.
- 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.
- De Cueto, M. y Pascual, Á. 2009. Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En: Pahissa, A. (Ed.). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. ICG Marge. Barcelona, España. pp. 15-31.
- Delgado-Ruiz, F., Guevara-Hernández, F. y Acosta-Roca, R. 2018. Criterios campesinos para la selección de maíz (*Zea mays* L.) en Villaflores y Villa Corzo, Chiapas, México. *CienciaUAT*. 13: 123-134.
- Devlin, T. M. 2004. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté. España.
- Díaz-Flores, M., Álvarez Sánchez, P. y Martínez Vázquez, M. 1995. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de lactonas sesquiterpénicas germacranólidas contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias. *CIENCIA Egro-sum*. 1 (2): 104-108.
- Díaz-González, G. J. 2010. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia. Editorial Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Díaz-Osorio, M. Á., Díaz-Guevara, P. L., Rodríguez-Cárdenas, E. C., Montañó-Valencia, L. A., Medina-Alfonso, M. I., González-Patiño, G. I. y Ralpe, M. E. 2014. Caracterización fenotípica y genotípica de *Salmonella* Typhimurium variante 5-asociada a un brote de enfermedad transmitida por alimentos en el municipio de Paz de Río, Boyacá, 2010. *Latreia*. 1 (27): 23-30.

- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México.
- Domínguez-Villegas, V. 2014. Estudio bioinformático de flavanonas isoprenílicas antiinflamatorias libres y vehiculizadas en sistemas nanoestructurados para aplicación tópica. Tesis de Doctorado. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Barcelona. <https://docplayer.es/66761697-Estudio-biofarmaceutico-de-flavanonas-isoprenilicas-antiinflamatorias-libres-y-vehiculizadas-en-sistemas-nanoestructurados-para-aplicacion-topica.html>. Consultado el 3 de junio de 2019.
- Doss, A., Mohammed Mubarak, H. y Dhanabalan, R. 2009. Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science and Technology*. 2 (2): 41-43.
- Dufourc, E. J. 2008. Sterols and membrane dynamics. *Journal of Chemical Biology*. 1: 63-77.
- Elika. 2013. *Salmonella*. http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf. Consultado el 4 de julio de 2019.
- Ellermeier, C. D. y Schlauch, J. M. 2006. The genus *Salmonella*. *Prokaryotes*. 6: 123-158.
- Enriz, R. D., Rodriguez, A. M. y Jauregui, E. A. 1998. Estudio de la relación estructura-actividad citoprotectora gástrica de lactonas sesquiterpénicas y compuestos estructuralmente relacionados. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 1 (17): 41-52.
- 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 de Doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A. y Vargas-Remolina, L. V. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógeno. *Revista Chilena de Infectología*. 4 (33): 438-450.
- Fawcett, S., Smith, A. R., Sundue, M., Burleigh, J. G., Sessa, E. B., Li-Yaung, K., Cheng-Wei, C., Testo, W. L., Kessler, M., Consortium, G. y Barrington, D. S. 2021. A global phylogenomic study of the Thelypteridaceae. *Systematic Botany*. 4 (46): 891-915.
- Fernández-Calienes, V. A., Mendiola-Martínez, J., Monzote-Fidalgo, L., García-Parra, M., Sariago-Ramos, I., Acuña-Rodríguez, D., Scull-Lizama, R. y Gutiérrez-Gaitén, Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 3 (61): 254-258.
- Fernández-Ferrán, R., Rodríguez-Pérez, C., Rodríguez-Ribalta, I. A. y Gómez-Martínez, F. 2003. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. *Revista Cubana de Pediatría*. 3 (75). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312003000300010. Consultado el 25 de junio de 2019.
- Galvis-García, J. H., Ocampo, D. M., Ocampo, R. y Gutiérrez-Cárdenas, P. D. A. 2012. Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimoloides* (Annonaceae) sobre *Artemia salina*. *Boletín Científico Museo de Historia Natural*. 2 (16): 17-22.
- Gaona-Hernández, M. A. 2016. Portadores de *Staphylococcus aureus* como factor de riesgo en la infección intrahospitalaria. *Revista Ciencias de la Salud*. 1 (14): 5-7.
- García-Apac, C., Pardo-Valdespino, J. y Seas-Ramos, C. 2003. Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso. *Revista Médica Herediana*. 4 (14): 221-223.

- García-Luján, C., Martínez Romero, A., Ortega Sánchez, J. L. y Castro Barraza, F. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*. 9: 86-96.
- García-Martos, P., Fernández del Barrio, M. T. y Paredes Salido, F. 1997. Microbiología clínica aplicada. Díaz de Santos, S. A. Madrid, España.
- Garza-Velasco, R., Zúñiga-Rangel, O. y Perea-Mejía, L. M. 2013. La importancia clínica actual de *Staphylococcus aureus* en el ambiente intrahospitalario. *Educación Química*. 1 (24): 8-13.
- Gestel, J. V., Vlamakis, H. y Kolter, R. 2015. From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLOS Biology*. <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002141>. Consultado el 4 de Julio de 2019.
- Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N. A. y Darwiche, N. 2010. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. *Drug Discovery Today*. 16 (15): 668-678.
- Ghosh, D. 2015. Tannins from foods to combat diseases. *International Journal of Pharma Research and Review*. 4 (5): 40-44.
- Gimeno-Creus E. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*. 6 (23):80-84.
- Gómez-Álvarez, C. A., Leal Castro, A. L., Pérez de Gonzalez, G. M. J. y Navarrete Jiménez, M. L. 2005. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*. 1 (53): 27-34.
- Gómez-Álvarez, R. 2012. Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*. 35: 43-49.
- Gómez-Duarte, O. G. 2014. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*. 5 (31): 577-586.

- Gonçalves-Alvim, S. J., Lana, T. C., Ranieri, B. D. y Wilson-Fernandes, G. 2011. Test of hypotheses about herbivory and chemical defences of *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) in Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Botany*. 2 (34): 223-230.
- Gonzales-Escalante, E., Vicente-Taboada, W., Champi-Merino, R., Soto-Pastrana, J., Flores-Paredes, W., Lovera-García, M., Chuquiray-Valverde, N., Bejarano-Cristobal, C., Puray-Chávez, M. y León-Sandoval, S. 2013. Metallo- β -lactamasas en aislamiento clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2 (30): 241-245.
- González-López, A. M., Quiñones-Aguilar, E. E. y Rincón-Enríquez, G. 2016. Actividad biológica de los terpenos en el área agroalimentaria. En: Espinoza Andrews, H., García Márquez, E. y Gastélum Martínez, E. (Editores). Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. A.C (CIATEJ). Zapopan, Guadalajara, Jalisco.
- González-López, J. J., Larrosa, N., Planes, A. Ma. y Bartolomé-Comas, R. Ma. 2007. A propósito de un paciente con infección por *Salmonella entérica* serotipo Typhi resistente al ácido nalidíxico. Indicación terapéutica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 10 (25): 655-658.
- Gordon, R. J. y Lowy, F. D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*. (46): 350-359.
- Granado-Sánchez, D., Ruíz-Puga, P. y Barrera-Escorcía, H. 2008. Ecología de la herbívora. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 1 (14): 51-64.
- Granado-Serrano, A. B. 2009. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

- Guevara G, J. M., Cipriani, R., Giraldo, D., Mezarina, E., Sánchez, I., Villagómez, Z., Antezana, A., Alagón, R. y Carranza, R. 2014. *Shigella sonnei*: ¿Está ocurriendo un cambio en nuestro medio?. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2 (75): 189-191.
- Hahne, H., Mäder, U., Otto, A., Bonn, F., Steil, L., Bremer, E., Hecker, M. y Becher, D. 2010. A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *Journal of Bacteriology*. 3 (192): 870- 882.
- Harborne, J. B. 1999. Classes and functions of secondary products from plants. https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789812817273_0001. Consultado el 18 de junio de 2019.
- Hassler, M. 2018. World Ferns: Checklist of Ferns and Lycophytes of the World (version Apr 2018). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2018 Annual Checklist (Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2018.
- Hermosa, R., Cardoza, R. E., Belén, R. M., Gutiérrez, S. y Monte, E. 2014. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. En: Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I. y Tuohy, M. G. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier. España.
- Hidrobo-Guzmán, R. J. 2013. Análisis comparativo por cromatografía líquida de alta resolución de los metabolitos secundarios de diferentes poblaciones de *Mikania micrantha*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Central del Ecuador. Quito.
- Ibraheim, Z. Z., Ahmed, A. S. y Gouda, Y. G. 2011. Phytochemical and biological studies of *Adiantum capillus-veneris* L. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 19: 65-74.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 1995. Villa Corzo estado de Chiapas. Cuaderno estadístico municipal. México. https://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem04/info/chs/m107/c07107_05.xls. Consultado el 2 de abril de 2019.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2019. Mapas. <https://www.inegi.org.mx/app/mapas/>. Consultado el 2 de noviembre de 2019.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. DATABiO. s.f. *Pseudomonas aeruginosa*. <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Pseudomonas+aeruginosa+2017.pdf/7e1ed73b-eca5-4578-a4f7-1c8847e6a799>. Consultado el 11 de febrero de 2020.
- Jarial, R., Shard, A., Thakur, S., Sakinah, M., Zularisam, A. W., Rezanía, S., Kanwar, S. S. y Singh, L. 2018a. Characterization of flavonoids from fern *Cheilanthes tenuifolia* and evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. *Journal of King Saud University-Science*. 30: 425-432.
- Jarial, R., Thakur, S., Sakinah, M., Zularisam, A. W., Sharad, A., Kanwar, S. S. y Singh, L. 2018b. Potent anticancer, antioxidant and antibacterial activities of isolated flavonoids from *Asplenium nidus*. *Journal of King Saud University-Science*. 30: 185-192.
- Jubair, N., Rajagopal, M., Chinnappan, S., Binti Abdullah, N. y Fatima, A. 2021. Review on the antibacterial mechanism of plant-derived compounds against multidrug-resistant bacteria (MDR). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 16: 1-30.
- Jurado-Jiménez, R., Arenas-Muñoz, C., Doblado-Delgado, A., Rivero, A. y Torre-Cisneros, J. 2010. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*. 52 (10): 3497-3501.
- Karper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, T. H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*. 2: 123-140.

- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V. y Fazly-Bazzaz, B. S. 2019. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 8 (16): 1-28.
- Kougan, G. B., Tabopda, T., Kuete, V. y Verpoorte, R. 2013. Simple phenols, phenolic acids, and related esters from the medicinal plants of Africa. En: Kuete, V. (Eds.). *Medicinal plant research in Africa. Pharmacology and Chemistry*. Elsevier. Pp. 225 - 249.
- Lan, R., Alles, M. C., Donohoe, K., Martínez, M. B. y Reeves, P. R. 2004. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infection and Immunity*. 9 (72): 5080-5088.
- León-Ramírez, S. 2002. Shigelosis (disentería bacilar). *Salud en Tabasco*. 1 (8): 22-25.
- Lizarbe-Iracheta, A. 2009. Bacterias y virus ¿cómo nos defendemos?. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*. 1 (103): 115-172.
- Llop, A., Valdés-Dapena, M. y Zuazo, J. 2001. *Microbiología y parasitología médica*. Tomo 1. Editorial de Ciencias Médicas. La Habana, Cuba.
- López-Edgar, G. 2013. Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- López-Luengo, M. T. 2003. Plantas medicinales de aplicación en dermofarmacia. *Offarm*. 22 (11): 122-125.
- López-Luengo, M. T. 2004. Los aceites esenciales. Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *OFFARM*. 23 (7): 88-91.
- Loyola-Vargas, V. M., Sánchez-Iturbe, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L. C., Galaz-ávalos, R. M. y Moreno-Valenzuela, O. 2004. Biosíntesis de los

alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*. 48:67-94.

Luján-Roca, D. Á. 2014. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 4 (48): 465-474.

Mallolas-Masferrer, J. y Vila-Estapé, J. 2002. Infecciones causadas por *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Medicine*. 8 (64): 3398-3407.

Manera, C., Aimaretto, C. y Raimondi, K. 2017. Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Shigella* en un hospital regional. <http://cobico.com.ar/prevalencia-y-resistencia-antimicrobiana-de-shigella-en-un-hospital-regional/>. Consultado el 28 de junio de 2019.

Marcoleta, A., Toro, C., Prado, V., Serrano, M., Fernández, P., Benadof, D., Camponovo, R., Campos, V., Porte, L., Zamorano, J., Ortega, C., Urqueta, B. y Ulloa, M. T. 2013. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella sonnei* aisladas durante tres períodos diferentes en la Región Metropolitana, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 6 (30): 616-621.

Marquilles-Bonet, C., Alexandre-Lozano, S. y Real-Gatius, J. 2015. Prevalencia de infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en heridas crónicas en atención primaria de Lleida. Estudio retrospectivo. *Gerokomos*. 4 (26): 157-161.

Martínez M., A. 2003. Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Martínez-Echeverría, M. T., Betancourt-Guerra, I. C. y Morejón-García, M. 2017. Análisis fitoquímico de los extractos del fruto de la especie *Cordia collococca*. *Cultivos Tropicales*. 2 (38): 7-14.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, Ma. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 17 (6): 271-278.

- Martínez-Salas, E. y Ramos-Hilda, C. 2014. Biodiversidad de pteridophyta en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 110-113.
- Martin-Gordo, D. A. 2018. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 9 (1): 81-104.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L. y Anderson, J. E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 32 (2): 513-524.
- Meco-López, J. F., Pascual Fuster, V. y Solá Alberich, R. 2016. La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 28 (6): 283-294.
- Melara-Cruz, S. L. y Salazar-Artiga, B. G. 2012. Determinación de la multirresistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* sp. aislada a partir de muestras de chorizos comercializados en mercados de Santa Tecla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, Centro América.
- Mercado-Mercado, G., De la Rosa Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A. y Álvarez-Parrilla, E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*. 1 (28): 36-46.
- Mickel, J. T. y Smith, A. R. 2004. The pteridophytes of Mexico. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 88: 1- 1054.
- Minjarez, B. y Macías-Rodríguez, M. Á. 2016. Análisis bioinformático de cpDNA en seis especies del género *Adiantum*. *Revista de Sistemas Experimentales*. 3 (6): 1-12.
- Miranda-Martínez, M. 2002. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

- Molina, L. J. 2010. Género *Escherichia*. En: Molina, L. J., Manjarrez, Z. M. E., Tay, Z. J. Microbiología, bacteriología y virología. Méndez editores. México. Pp. 243-245.
- Molina, L. J. y Eslava, C. C. A. 2015. *Escherichia coli* diarrogénica. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>. Consultado el 23 de junio de 2019.
- Molina, L. J. y Uribarren, B. T. 2015. Infecciones por *Shigella* spp. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/shigella.html>. Consultado el 27 de junio de 2019.
- Molina, L. J. y Uribarren, B. T. 2017. Generalidades de bacterias. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>. Consultado el 29 de junio de 2019.
- Mollinedo-Patzi, A. M. y Gonzáles-Villalobos, C. 2014. Bacterias Gram negativas. *Revista de Actualización Clínica*. (49): 2609- 2613.
- Montalvo-Merino, A. B. y Bravo-Delgado, C. H. s.d. Salmonella. Universidad de la Cañada. <https://www.unca.edu.mx/eventos/salmonella.pdf>. Consultado el 10 de febrero de 2020.
- Monteros-Fernández, J. J. E. 2005. Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México.
- Morfín-Otero, R., Rangel Frausto, S. y Rodríguez Noriega, E. 2002. Infecciones producidas por bacterias grampositivas. Controversias relacionadas al desarrollo de resistencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2 (22): 46-50.
- Moses, T., Papadopoulou, K. K. y Osbourn, A. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 49 (6):439-462.

- Muhammad, M., Sarah-Ismail, Z., Schneider, H. y Hawkins, J. A. 2020. Medicinal use of ferns: an ethnobotanical review. *Sains Malaysiana*. 5 (49): 1003-1014.
- Muhammad-Saqib, I., Muhammad Medrar, H., Muhammad Siddique, A., Ghadir, A., Mahrukh, K., Sohail, A. y Shakirullah. 2014. In vitro phytochemical, antibacterial, and antifungal activities of leaf, stem, and root extract of *Adiantum capillus veneris*. *The Scientific World Journal*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925560/>. Consultado el 1 de Agosto de 2019.
- Muñiz Díaz de-León, M. E. M., Mendoza-Ruíz, A. y Pérez-García, B. 2005. Uso de los helechos y plantas afines. *Etnobiología*. 5: 117-125.
- National Center for Biotechnology Information. s.f. PubChem Database. Flavan-3-ol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flavan-3-ol>. Consultado el 11 de agosto de 2019.
- Nelce-Mailoa, M., Mehendradatta, M., Laga, A. y Djide, N. 2014. Antimicrobial activities of tannins extract from guava leaves (*Psidium guajava* L) on pathogens microbial. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 1 (3): 236-241.
- Neu. H. C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 257: 1064-1073.
- Niranja-Reddy, V. L., Ravikanth, V., Prabhakar-Rab, T., Diwan, P. V. y Venkateswarlu, Y. 2001. A new triterpenoid from the fern *Adiantum lunulatum* and evaluation of antibacterial activity. *Phytochemistry*. 2 (56): 173-175.
- Ochoa, T. J., Mercado, E. H., Durand, D., Rivera, F. P., Mosquito, S., Contreras, C., Riveros, M., Llundue, A., Barletta, F., Prada, A. y Ruiz, J. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 1 (28): 13-20.
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguirre, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L. A., y Ramos-Jimenez, A. 2015. Taninos

- hidrolizables; bioquímica y aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*. 1 (31): 55-66.
- Oliveira-Moura, I., Costa-Moura, L. y Salino, A. 2016. Two new species of *Goniopteris* (Thelypteridaceae) from Brazil. *Brittonia*. 6 (68): 448-454.
- Oliveira-Souza, C., Paula-Ramos, F. L., Melo-Mota, C., Souza dos Santos, L. V. y Luiza-Lopes, M. 2010. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas en el estado de Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazonica de Saúde*. 2 (1): 61-65.
- Oliveros, C. A. 2013. Papel de los reguladores globales en la expresión de la fimbria Lpf2 en *E. coli* enterohemorrágica. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias. Benémerita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. *E. coli*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Consultado el 11 de junio de 2019.
- Ossa-Giraldo, A. C., Echeverri-Toro, L. M., Santos, M. Z., García, M. G., Agudelo, Y., Ramírez, F. y Ospina, S. 2014. Factores de riesgo para infección por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente en un hospital de alta complejidad. *Revista Chilena de Infectología*. 4 (31): 393-399.
- Othman, L., Sleiman, A. y Abdel-Massih, R. M. 2019. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in Middle Eastern plants. *Frontiers in Microbiology*. (10): 1-28.
- Otto, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* the “accidental” pathogen. *Nature Reviews*. 7: 555-567.
- Otto, M. 2014. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 1106: 17-31.
- Pacheco-Jiménez, E. N. 2012. Determinación del contenido de ácido ascórbico y la presencia de terpenos en un grupo de briófitas, propias de la zona Amazónica Norte del Ecuador, expuestas a la acción de una dosis de glifosato. Tesis de

Licenciatura. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional. Quito.

- Paiva P. M. G., Gomes, F. S., Napoleao, T. H., Sá, R. A., Correia, M. T. S. y Coelho, L. C. B. 2010. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. En: Méndez-Vilas (ed). Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz, España. 369-406.
- Patra, A. y Saxena, J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91: 24–37.
- Peñarrieta, M. J., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. y Bravo, J. A. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*. 31 (2): 68-81.
- Percival, S. L. y Williams, D. W. 2014. Shigella. En: Percival, S. L., Yates, M. V., Williams, D. W., Chalmers, R. M. y Gray, N. F. (Eds.). Microbiology of Waterborne Diseases. Microbiological Aspects and Risks. Academic Press. Gran Bretaña. Pp. 223-236.
- Peredo-Luna, H. A., Palou-García, E. y López-Malo, A. 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3 (1): 24-32.
- Pereira Da-Silva, T. R. y Antunes De-Paiva, J. G. 2012. Fitoquímica preliminar em monilófitas cultivadas no distrito federal, Brasil. *Rojasiana*. 1-2 (11): 31-43.
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*. 11 (4):195-211.
- Pérez-Farrera, M. A., López-Molina, M. E. y López-Cruz, A. 2013. Los helechos (Pteridophyta). En: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la

- Biodiversidad (CONABIO). La biodiversidad en Chiapas: estudio de estado. CONABIO. México. Pp.103-109.
- Pérez-García, B. y Reyes-Jaramillo, I. 1993. Helechos: propagación y conservación. *Ciencias*. 30: 11-17. <https://www.revistaciencias.unam.mx/es/180-revistas/revista-ciencias-30/1671-helechos-propagaci%C3%B3n-y-conservaci%C3%B3n.html>. Consultado el 24 de agosto de 2019.
- Pérez-García, B., Riba, R. y Smith, A. R. 1999. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Thelypteridaceae. <http://inecolbajio.inecol.mx/floradelbajio/documentos/fasciculos/ordinarios/Thelypteridaceae%2079.pdf>. Consultado el 25 de agosto de 2019.
- Pérez-Ibañez, N. M. 2013. Terpenos. Farmacognosia y medicamentos herbarios. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. <http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/7969/1/9.TERPENOS%202013-2014.pdf>
- Picman, A. K. 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical systematics*. 3 (14): 255-281.
- Pinilla-Agudelo, G. A. 1998. Indicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia: compilación bibliográfica. Fundación Jorge Tadeo Lozano. Universidad de Bogotá. Colombia.
- Pino-Pérez, O. y Jorge-Lazo, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 1 (25): 34-43.
- Pinzón-Junca, A. 2019. *Pseudomonas*. *Acta Médica Colombiana*. 1 (44): 52.
- Pla, A., Hernández, A. y Gil, F. 2012. Evaluación de la toxicidad de aditivos y contaminantes presentes en alimentos. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. https://books.google.com.mx/books?id=MN6SyS8hZBUC&pg=PA86&dq=toxicidad&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjd5ov859_jAhVIT6wKHTEzB

BIQ6AEIRzAG#v=onepage&q=toxicidad&f=true. Consultado el 26 de julio de 2019.

- Plummer, D. T. 1981. Bioquímica práctica. 2ª edición. Editorial McGrawHill Latinoamericana. Bogotá, Colombia.
- Ponce, M. 2007. Sinopsis de las Thelypteridaceae de Brasil central y Paraguay. *Hoehnea*. 3 (34): 283-333.
- Ponce, M., Kieling-Rubio, M. A. y Windisch, P. G. 2010. O gênero *Thelypteris* (Thelypteridaceae, Polypodiopsida) no Estado do Mato Grosso, Brasil - I: subgêneros *Goniopteris* (C.Presl) e *Meniscium*(Schreb.) C.F. Reed. *Acta Botanica Brasilica*. 3 (24): 718-726.
- Prior, R. L. y Gu, L. 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*. 66 (18): 2264-2280.
- Prontuario de Información Geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos. s.d. Villa Corzo, Chiapas. http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/07/07107.pdf. Consultado el 2 de mayo del 2019.
- Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 51 (10): 3426-3431.
- Raj, K. P., Irudayaraj, V., Marimuthu, J. y Patric Raja, D. 2011. Phytochemical and antibacterial activity of epidermal glands extract of *Christella parasítica* (L.) H. Lev. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1: 8-11.
- 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.

- Ramos, G., Frutos, P., Giráldez, F. J. y Mantecón, A. R. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Revista Archivos de Zootecnia*. 47: 597-620.
- Renault, H., Jean-Etienne, B. y Björn, H. 2014. Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges. *Current Opinion in Plant Biology*. 19:27-34.
- Repetto-Jiménez, M. y Repetto-Kuhn, G. 2009. Toxicología fundamental. Editorial Díaz de Santos. Barcelona, España.
- Reyes-Luengas, A., Slinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M. E., Arteaga-Garibay, R. I. y Martínez-Peña, M. D. 2015. Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*. 3 (49): 277-290.
- Ríos, J. C., París, E. y Repetto, G. 2012. Intoxicaciones por plantas medicinales. Editorial Días de Santos. https://books.google.com.mx/books?id=D5uuO01iyVkC&pg=PA212&dq=toxicidad+de+sustancias+de+plantas&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjtuKiN8t_jAhVDRqwKHeVAAJAQ6AEIPTAD#v=onepage&q=toxicidad%20de%20sustancias%20de%20plantas&f=true. Consultado el 27 de julio de 2019.
- Rípodas, N. A., Fernández, M. D. y Macho, M. 2017. Investigación de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar*. 3 (73): 147-152.
- Rivero, M. A., Padola, N. L., Etcheverria, A. I. y Parma, A. E. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina*. 64: 352-356.
- Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E. H., Contreras, C., Rivera, F. P., Mosquito, S., Lluque, Á. y Ochoa, T. J. 2011. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC)

- provenientes de niños con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 1 (28): 21-28.
- Robins-Browne, R. M. y Hartland, E. L. 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17: 467-475.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F. y García, J. 2005. Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez, P. A. y Arenas, R. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. 2 (16): 166-167.
- Rodríguez-Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 5 (44): 464-475.
- Rodríguez-Enríquez, R. J. 2008. Caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. San Luis Potosí.
- Rojas-De-Astudillo, L., Jaramillo Jaramillo, C. y Lemus Barros, M. 2015. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios en plantas. Universidad Técnica de Machala. Venezuela.
- Ruiz-López, W. C. y Pinzón-López, Y. D. 2009. Correlación de los principales microorganismos en los ambientes intramural y extramural presentes en 3 jardines infantiles ubicados en las localidades de puente Aranda, Kennedy y Fontibón, para establecer su variación en el tiempo entre el 2007 y el 2009. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Bogotá, Colombia.
- Ruiz-Martínez, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. Barcelona.

- Ruiz-Reyes, E. y Suarez, M. 2015. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 1 (46):9-24.
- Sabaté-Brescó, M., Harris, L. G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., Geoff Richards, R. y Moriarty, T. F. 2017. Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. *Frontiers in microbiology*. 8 (1401): 1-24.
- Salem, M. M. Z., Gohar, M. Y., Camacho Díaz, L. M., El-Shanhorey, N. A. y Salem, M. A. Z. 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*. 5 (7): 418-426.
- Salino, A., Almeida, T. E. y Smith Reid, A. 2015. New combinations in Neotropical Thelypteridaceae. *PhytoKeys*. 57: 11-50.
- Salino, A., Leroy, C. J., Costa-Moura, L. y Oliveira-Moura, I. 2016. Four new species of the fern genus *Goniopteris* C. Presl (Thelypteridaceae) from Brazilian Atlantic Forest. *Phytotaxa*. 3 (255): 249-258.
- Samuelson, G. y Bohlin, L. 2009. Drugs of natural origin: a treatise of pharmacognosy. Swedish Pharmaceutical Press. 7 a edición. 807 pag.
- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., y Gänzle, M. G. 2011. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 1176-1184.
- Sang Cho, K., Lim, Y. R., Lee, K., Ho Lee, J. y Lee, I. S. 2017. Terpenes from forests and human health. *Toxicological Research*. 33 (2): 97-106.
- Santana-Romero, J. L., Calderón Marín, C. F., Martínez Luzardo, F., Pérez, R. M., Montalva Duquensne, M., Avila Cabrera, A. M. y Codorniú Hernández, E. 2002. Biodistribución y farmacocinética de taninos de *Pinus caribaea* Morelet Y *Casuarina equisetifolia* en ratones. *Revista Cubana de Farmacia*. 36 (2): 112-120.

- Sarker, S.; Nahar, L. y 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. *Métodos*. 4 (42): 321-324.
- Sejas-Claros, A., Zurita Céspedes, B. I., Rodríguez Álvarez, M. X., Espinoza Amurrio, J. B. y Sejas Revollo, M. 2016. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en portadores nasales del personal de enfermería-hospital Viedma. *Revista Científica Ciencia Médica*. 1 (19): 29-33.
- Silveyra, I. M., Pereyra, A. M., Alvarez, M. G., Villagran, M. D., Baroni, A. B., Deza, N., Carbonari, C. C., Miliwebsky, E. y Rivas, M. 2015. Aislamiento de *Escherichia coli* enteropatógeno O157:H16 de un caso de diarrea infantil y sus contactos familiares en La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 4 (47): 317-321.
- Simões, M., Bennett, R. N. y Rosa, E. A. S. 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*. 26: 746-757.
- Singh, M., Singh, N., Behari Khare, P. y Singh Rawat, A. K. 2008. Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 115: 327-329.
- Smith, A. R. 1976. New taxa and new combinations of *Thelypteris* from Guatemala. *Phytologia*. 3 (34): 231-233.
<https://www.biodiversitylibrary.org/page/12885352#page/244/mode/1up>.
Consultado el 25 de agosto de 2019.
- Soares, S. E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutricao de Brazil*. 15 (1): 71-81.
- Suárez-Medina, K. y Coy-Barrera, E. 2016. Diversidad de compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad

- en el metabolismo secundario. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 12 (2): 252-269.
- Szakiel, A., Pączkowski, C. y Henry, M. 2011. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*. 10: 471-491.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume. Castello de la Plana.
- Tay-Zavala, J. 2012. Microbiología y parasitología médicas de Tay. 4ª edición. Méndez editores. México.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. y Heydrich-Pérez, M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 3 (42): 131-138.
- The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 2010. *E. coli* enterohemorrágica. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli-es.pdf>. Consultado el 25 de junio de 2019.
- The New York Botanical Garden. 1999. Helechos. <https://www.youtube.com/watch?v=T69YKpADtnQ>. Consultado el 19 de diciembre de 2019.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, A. S. S. y Vijayakumar, R. 2018. An introductory chapter: secondary metabolites. En: Secondary metabolites. Vijayakumar, R. IntechOpen <https://www.intechopen.com/books/secondary-metabolites-sources-and-applications>. Consultado el 19 de junio de 2019.
- Tim-Cushnie, T. P., Cushnie, B. y Lamb, A. J. 2014. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44: 377-386.

- Tropicos. 2009. Flora Mesoamericana.
<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=26601964&projectid=3>.
Consultado el 25 de agosto de 2019.
- Truong, Dieu-Hien., Nguyen, D. H., Anh Ta, N. T., Vo Bui, A., Ha Do, T. y Chinh Nguyen, H. 2019. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and In vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*.
<https://www.hindawi.com/journals/jfq/2019/8178294/>. Consultado el 17 de diciembre de 2021.
- Unidad de Informática del Instituto de Química. 2015.
<https://uniiquim.iquimica.unam.mx/>. Consultado el 27 de octubre de 2020.
- United States Department of Agriculture. s.d. Ferns structure.
<https://www.fs.fed.us/wildflowers/beauty/ferns/structure.shtml>. Consultado el 23 de diciembre de 2021.
- Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E. y García-Pérez, M. E. 2017. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. 16: 15-29.
- Varela, G., Jasinski, C., Gadea, P., Noel, T. M., Inés, M. M., Arenas, C., Pardo, L., González, S., González, G., Sirok, A. y 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.
- Vargas-Alvarez, D., Soto-Hernández, M., González-Hernández, V. A., Engleman, E. M. y Martínez-Garza, Á. 2006. Kinetics of accumulation and distribution of flavonoids in guava (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia*. 1 (40): 109-115.
- Vázquez-Flores, A. A., Álvarez-Parrilla, A., López-Díaz, J. A., All-MNedrano, A. y De la Rosa, L. A. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química,

- ventajas y desventajas de su consumo. *TECNOCIENCIA Chihuahua*. VI (2): 84-93.
- Velázquez-Montes, E. 2010. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 80. Pteridaceae. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D.F.
http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/F80_p1-50.pdf. Consultado el 24 de agosto de 2019.
- Velázquez-Montes, E. y Aguirre-Hernández, E. 2015. Los helechos como plantas ornamentales. *Ciencia*.
https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/66_3/PDF/Helechos.pdf. Consultado el 24 de agosto de 2019.
- Vélez-Terranova, M., Campos Gaona, R. y Sánchez-Guerrero, H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17 (3): 489-499.
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J. y Navarro-García, F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*. 5 (49): 376-386.
- Vilela, A. E., González-Paleo, L. y Ravetta, D. A. 2011. Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral*. 21:1-11.
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87: 559-902.
- Vincent, P. y Kanna, R. 2007. Antibacterial activity of ferns *Christella parasítica* and *Cyclosorus interruptus* against *Salmonella* Typhi.
<http://www.genesandgenomes.yolasite.com/resources/Antibacterial%20activity%20of%20christella%20parasitica.pdf>. Consultado el 2 de marzo de 2019.
- Vivanco, J. M., Cosío, E., Loyola-Vargas, V. M. y Flores, H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas.

<https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/tienen-vida-los-virus-392/mecanismos-quimicos-de-defensa-en-las-plantas-4039>.

Consultado el 17 de junio de 2019.

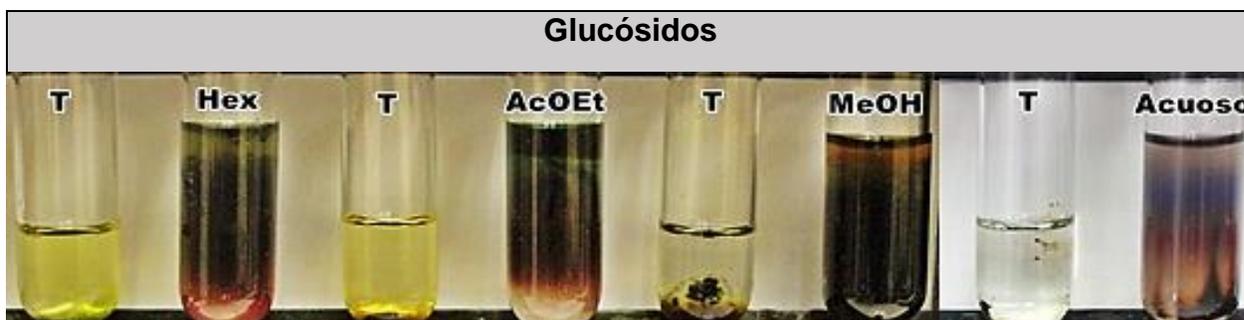
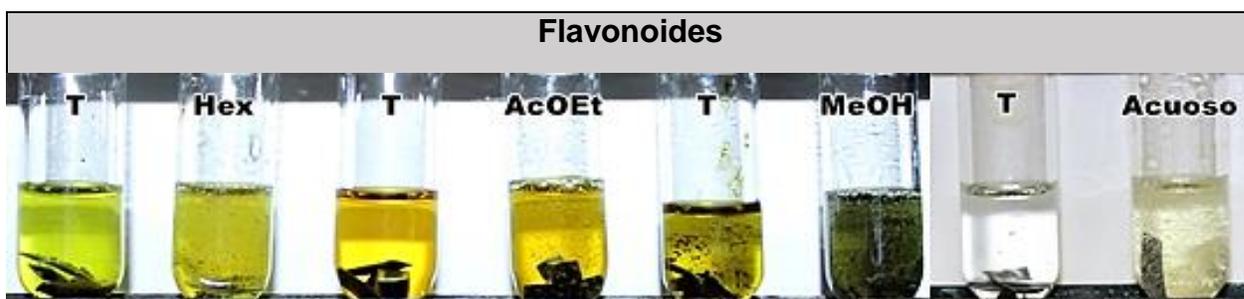
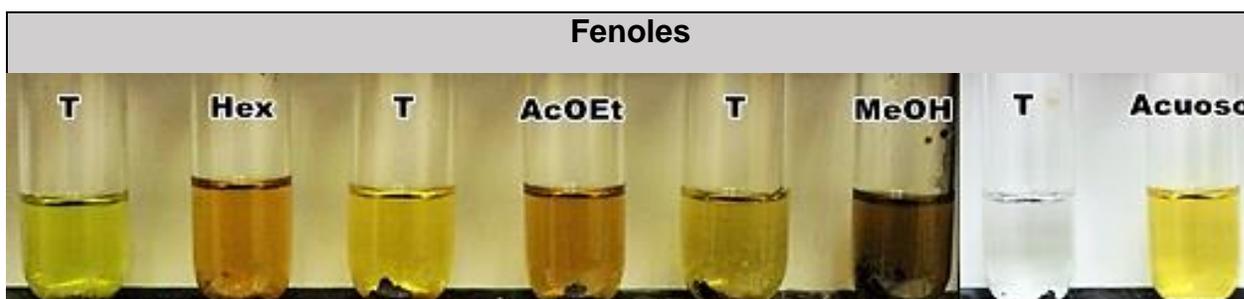
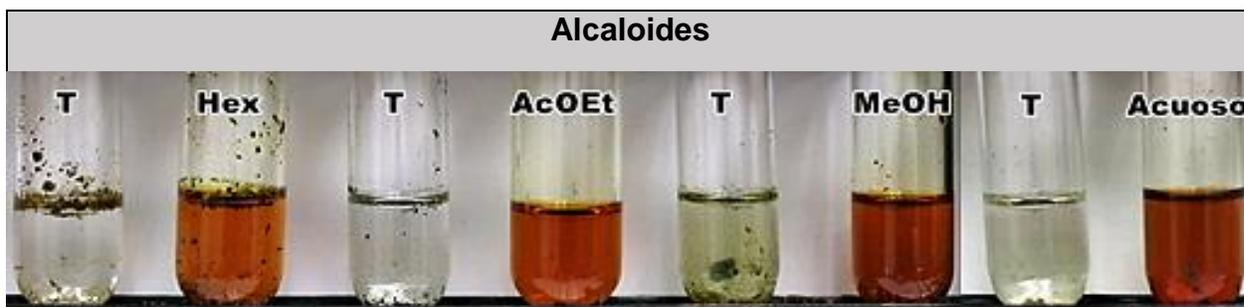
- Vuong, C. y Otto, M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infections*. 4: 481-486.
- Wallach, P., López, L. L., Oberpaur, C., Vacarezza, F. y Maier, L. 2010. Estudio preliminar de efectos antimicrobianos “*in vitro*” del musgo *Sphagnum magellanicum* BRID. *Agro Sur*. 38: 80-86.
- Wink, M. 2015. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*. 2 (3): 251-286.
- Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C. y Woods, G. L. 2008. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color 6a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Winter, W. P. y Amoroso, V. B. 2003. Cryptogams: ferns and fern allies. Backhuys Publishers, Leiden. Bogor, Indonesia.
- Young-Kang, W., Ji, Z. Q. y Min Wang, J. 2009. Composition of the essential oil of *Andiantum flabellulatum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 4 (45): 575-577.
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H. y Soto-Padilla, M. Y. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*. 3 (25): 129-143.

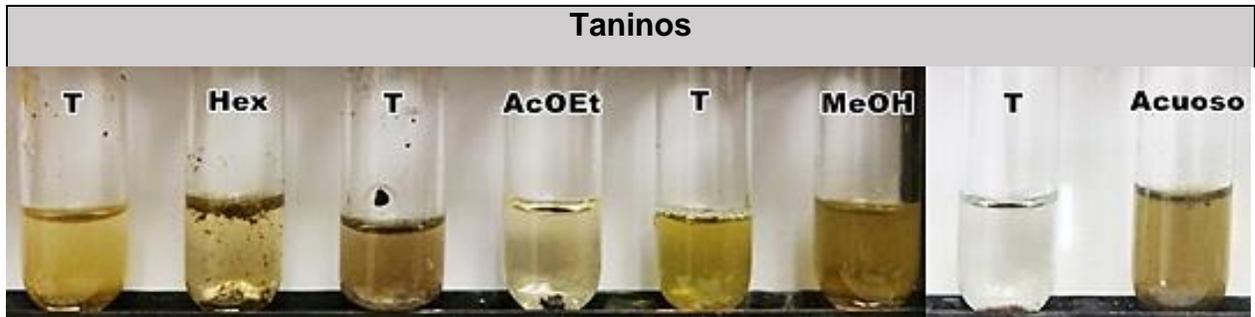
XII. ANEXO

Anexo 1. Rendimiento de los extractos de las especies estudiadas.

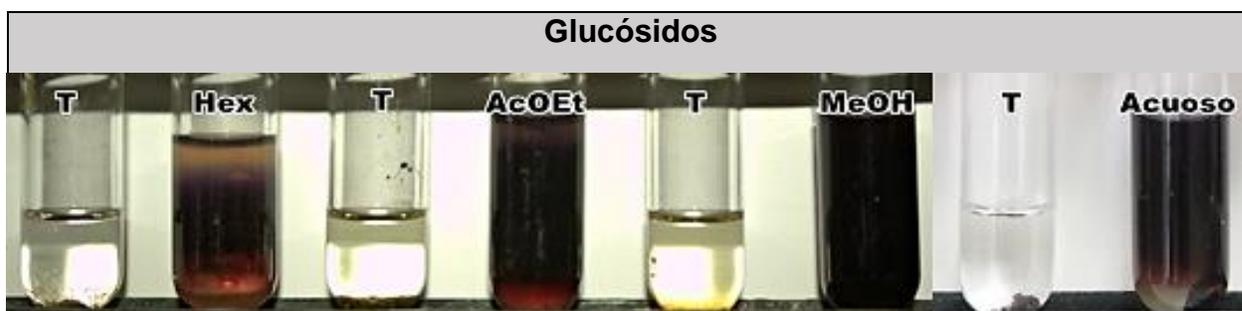
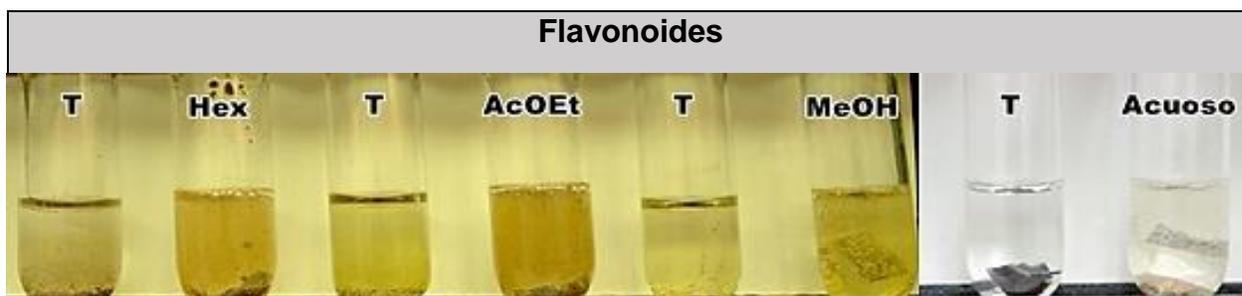
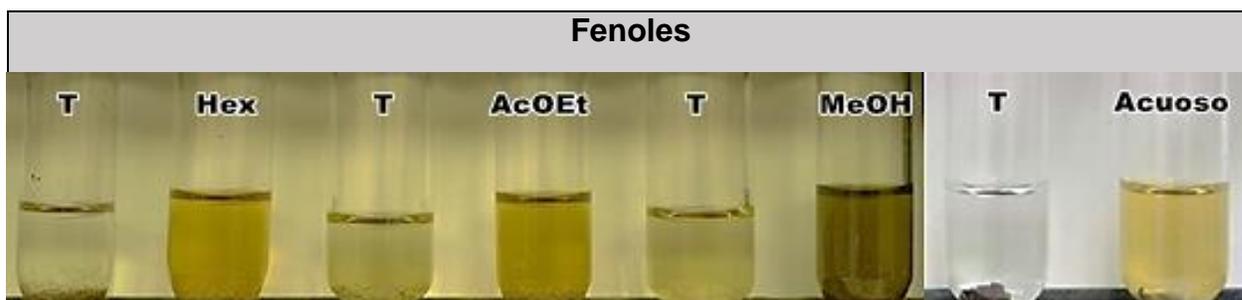
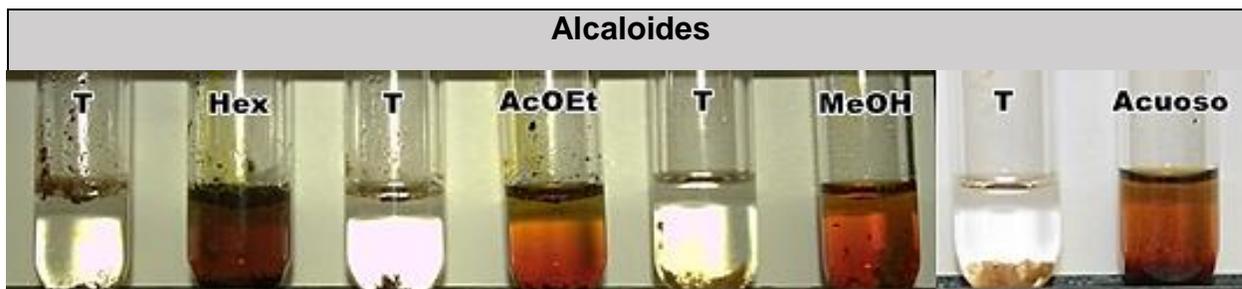
Especie	Estructura botánica	Solvente	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
<i>G. stolzeana</i>	Fronδας	Hex	2.10	1.09
		AcOEt	2.34	1.21
		MeOH	11.90	6.17
		Acuoso	1.23	0.88
	Rizomas+Raíces	Hex	1.41	0.87
		AcOEt	1.39	0.86
		MeOH	10.64	6.65
		Acuoso	1.98	1.13
<i>A. amplum</i>	Fronδας	Hex	3.88	2.01
		AcOEt	4.39	2.28
		MeOH	11.38	5.89
		Acuoso	4.90	3.5
	Rizomas+Raíces	Hex	4.18	2.61
		AcOEt	3.66	2.29
		MeOH	10.15	6.34
		Acuoso	4.15	2.37

Anexo 2. Prueba de identificación de metabolitos secundarios de extractos de frondas de *G. stolzeana*.

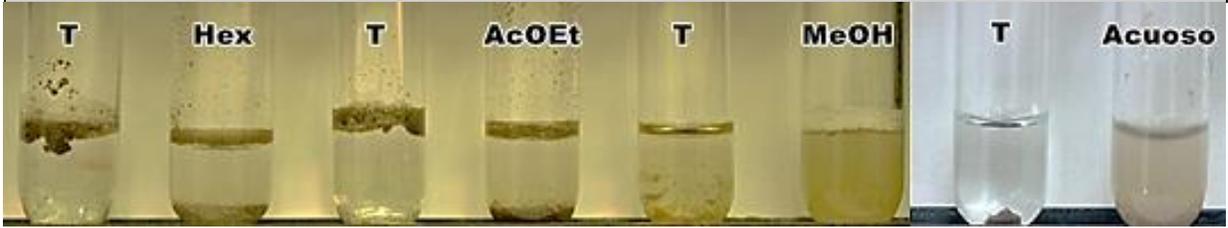




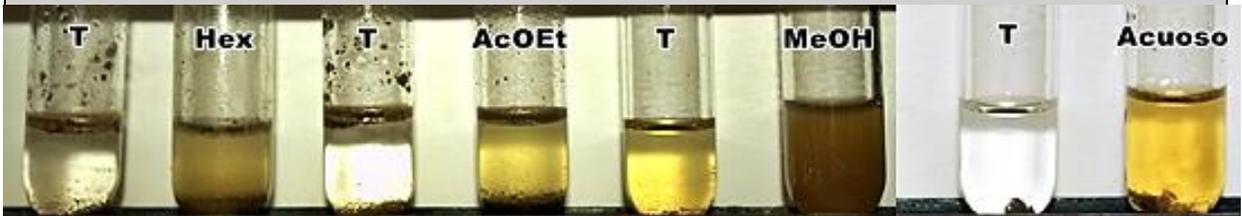
Anexo 3. Prueba de identificación de metabolitos secundarios de extractos de rizomas+raíces de *G. stolzeana*.



Saponinas



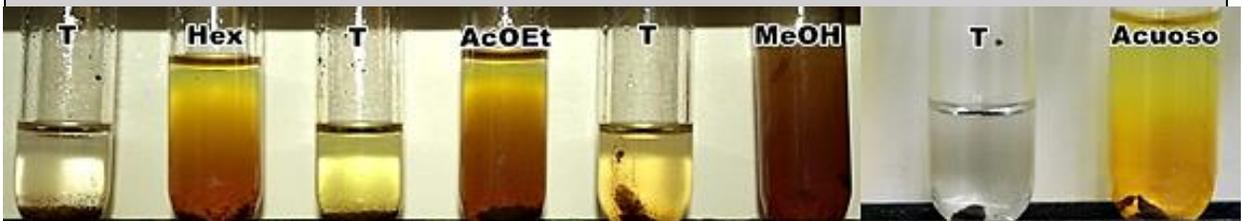
Taninos



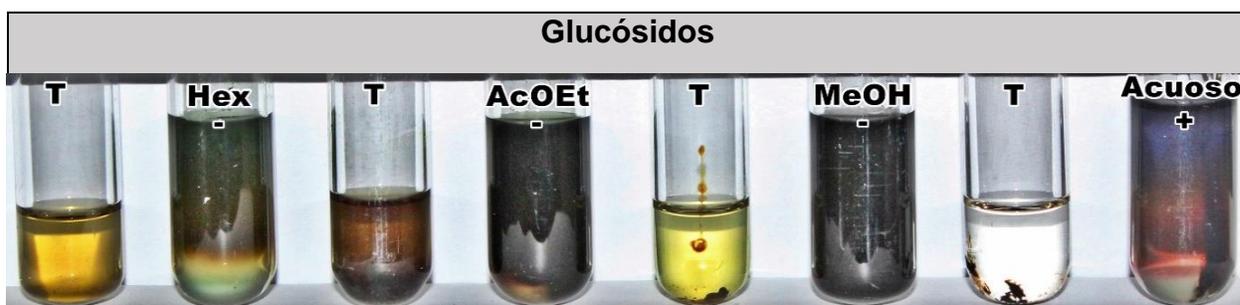
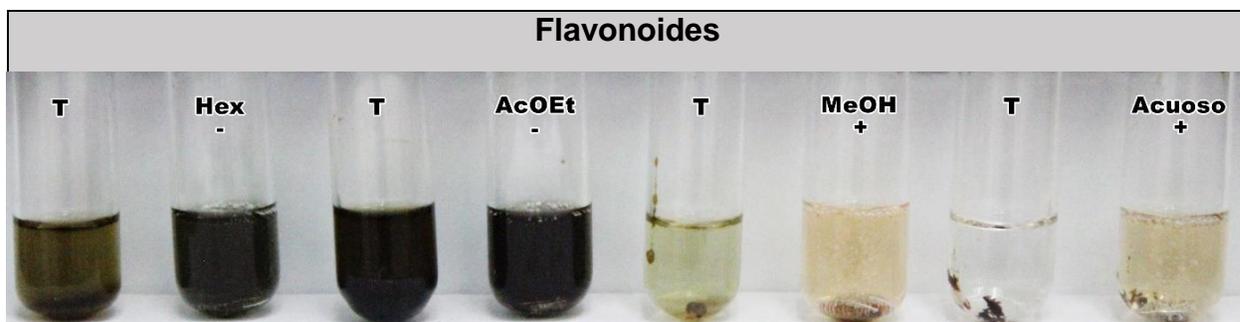
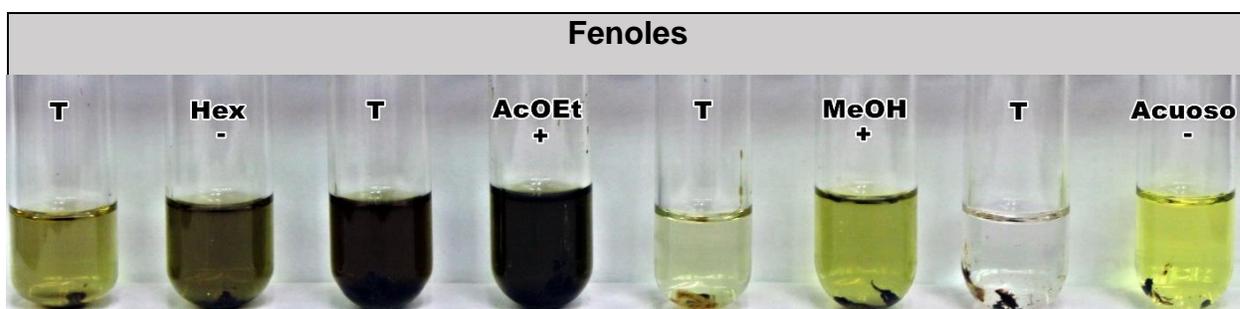
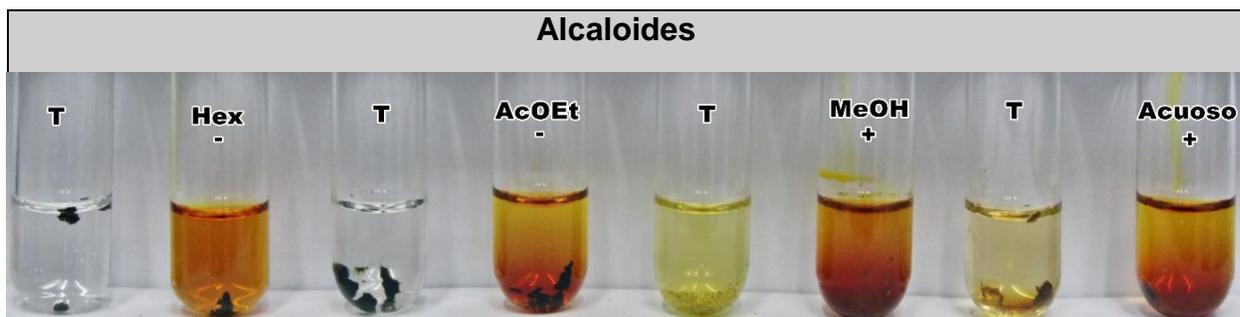
Terpenos-esteroides



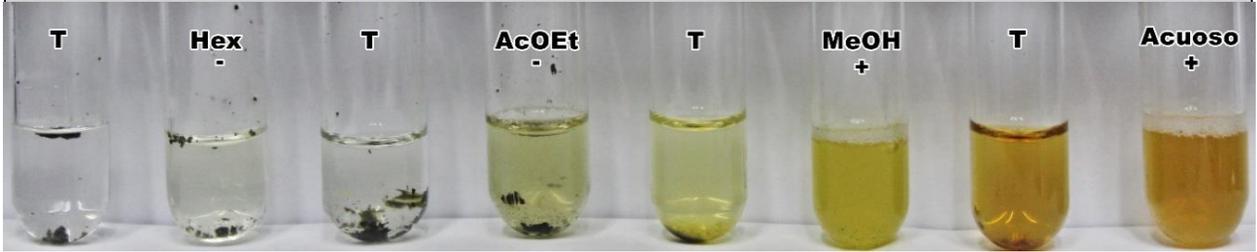
Lactonas sesquiterpénicas



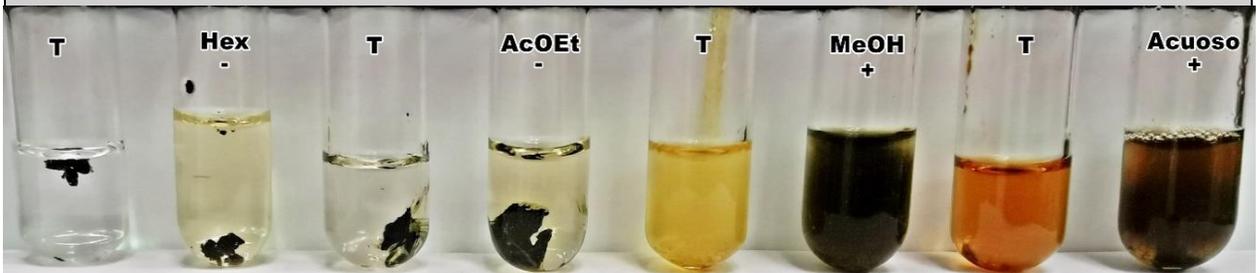
Anexo 4. Prueba de identificación de metabolitos secundarios de extractos de frondas de *A. amplum*.



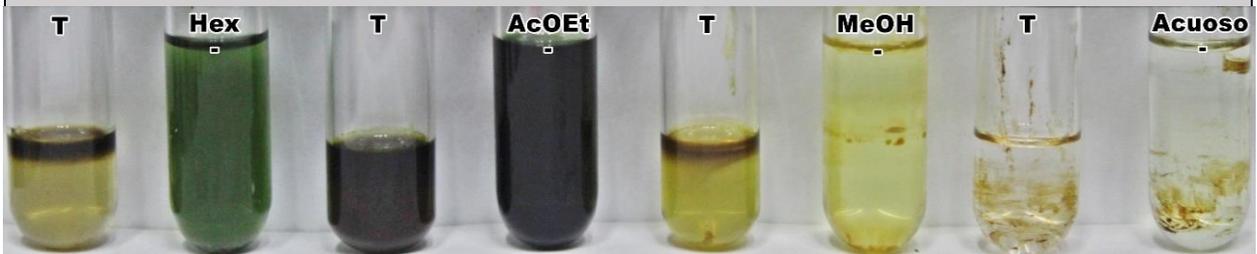
Saponinas



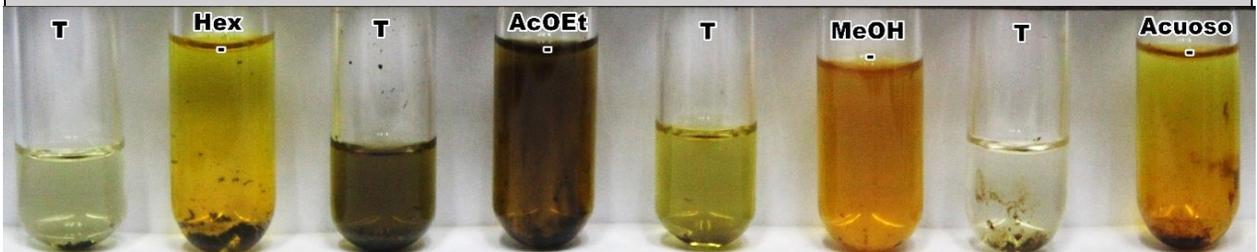
Taninos



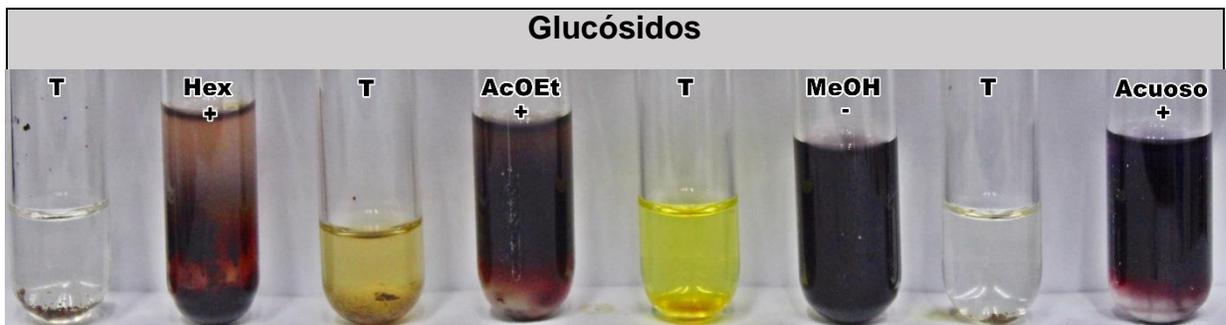
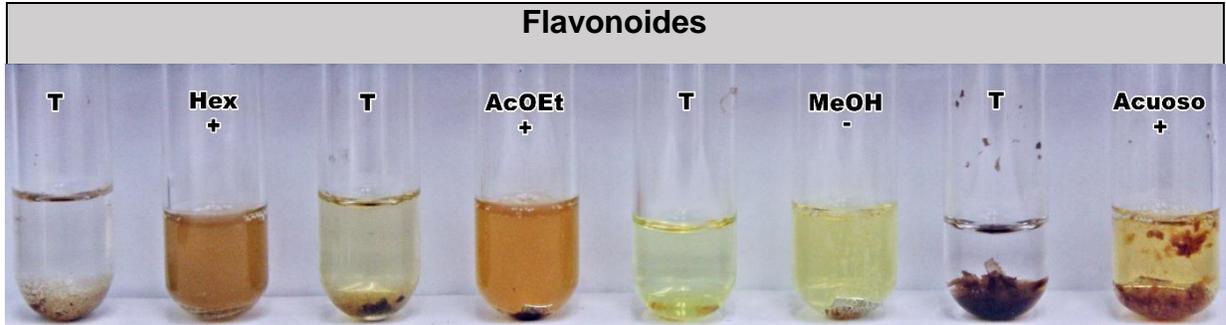
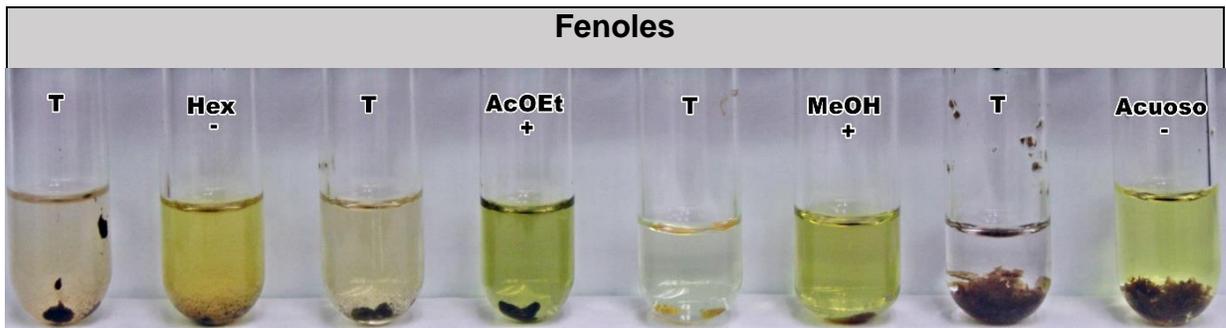
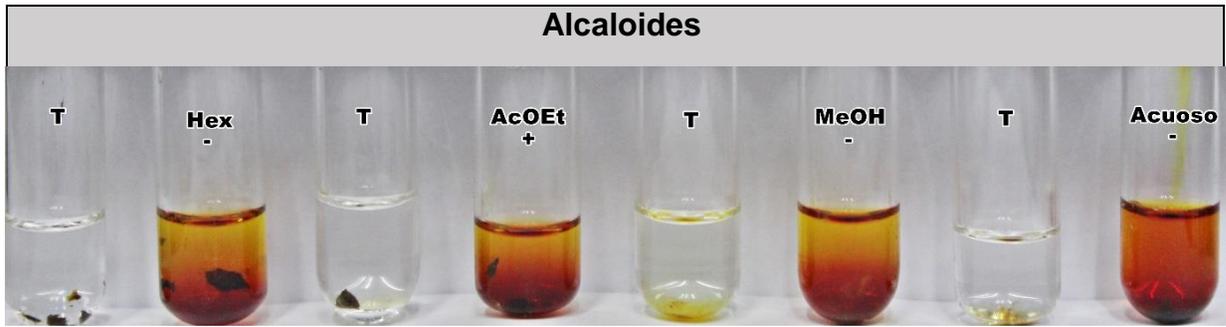
Terpenos-esteroides

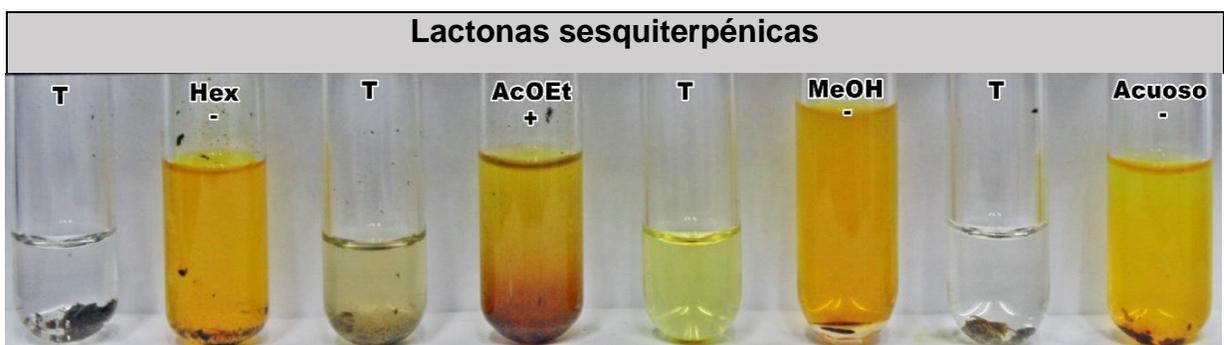
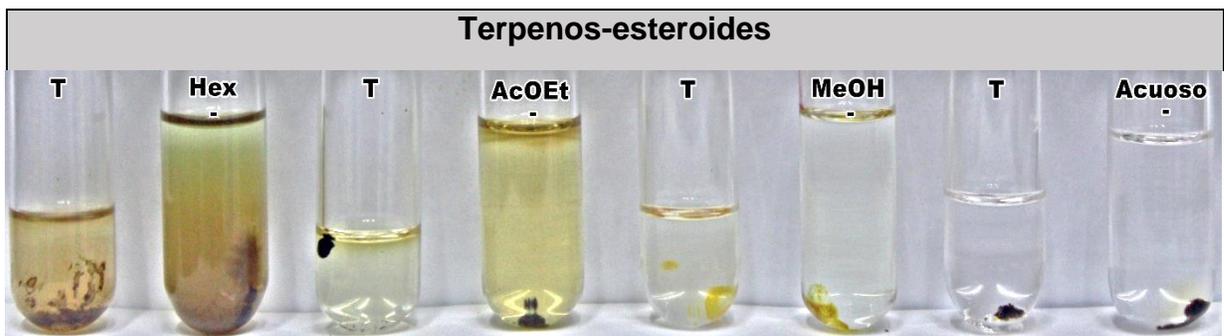
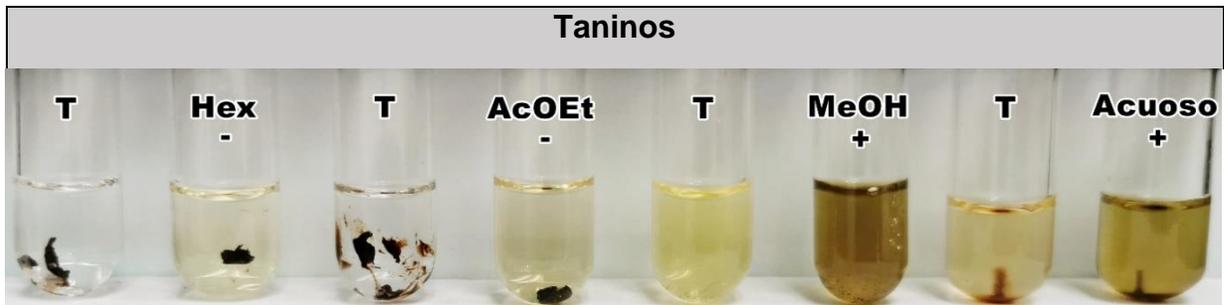
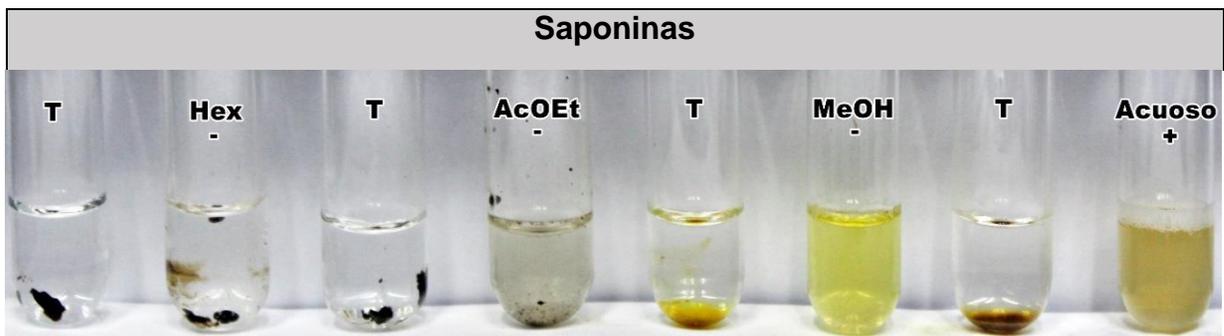


Lactonas sesquiterpénicas

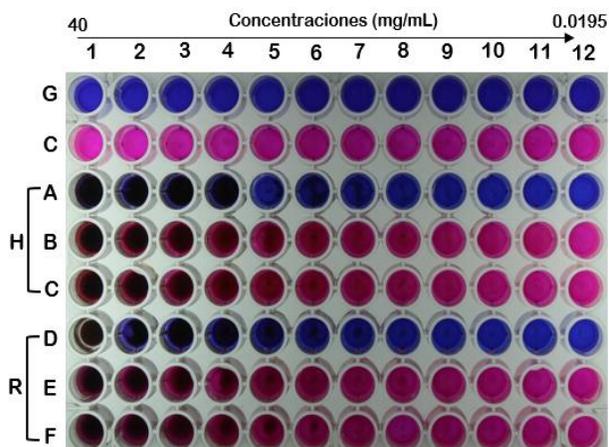


Anexo 5. Prueba de identificación de metabolitos secundarios de extractos de rizomas+raíces de *A. amplum*.

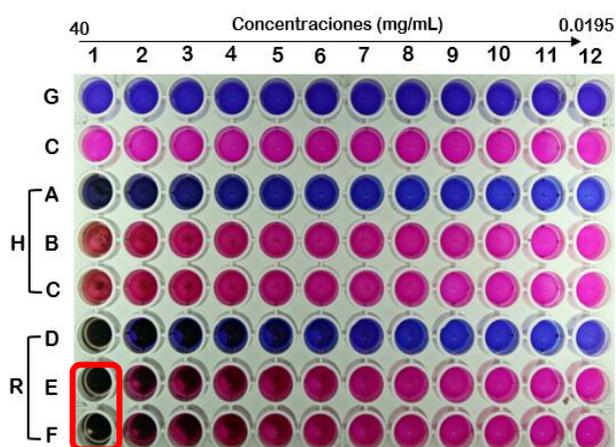




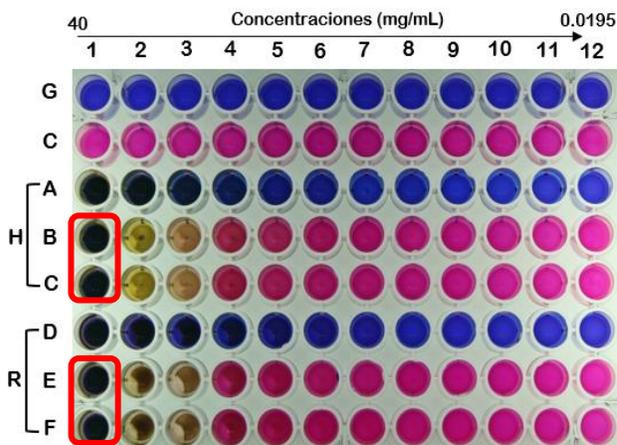
Anexo 6. CIM de extractos de *G. stolzeana* frente a bacterias Gram positivas



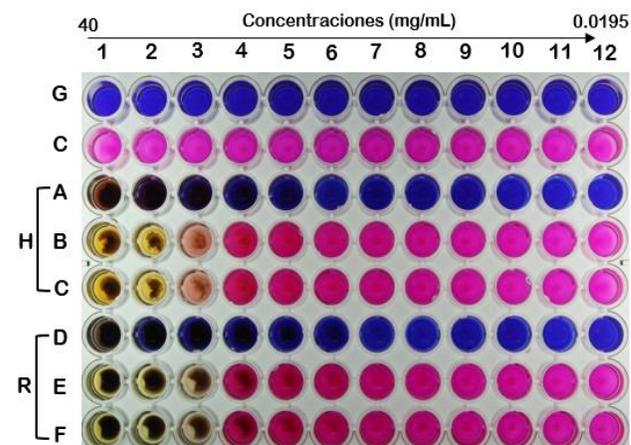
CIM de extracto hexánico contra *S. aureus*



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. aureus*



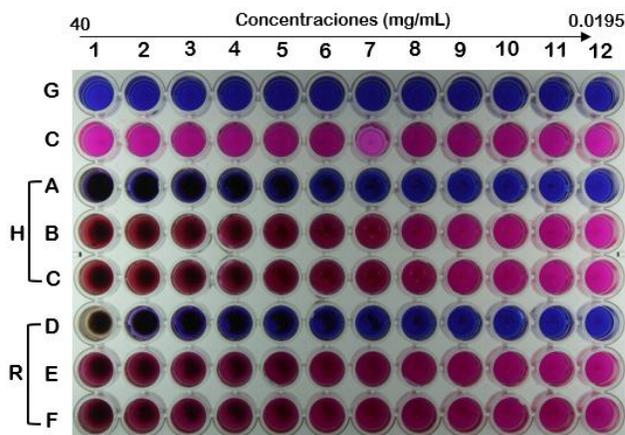
CIM de extracto metanólico contra *S. aureus*



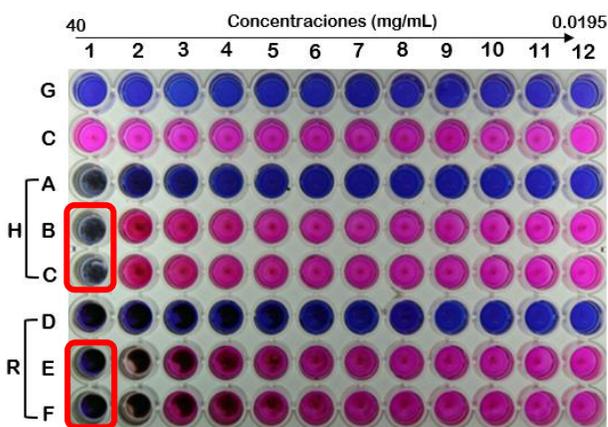
CIM de extracto acuoso contra *S. aureus*

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

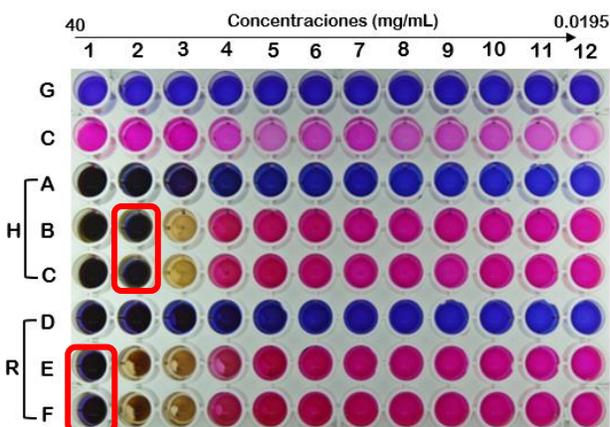
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



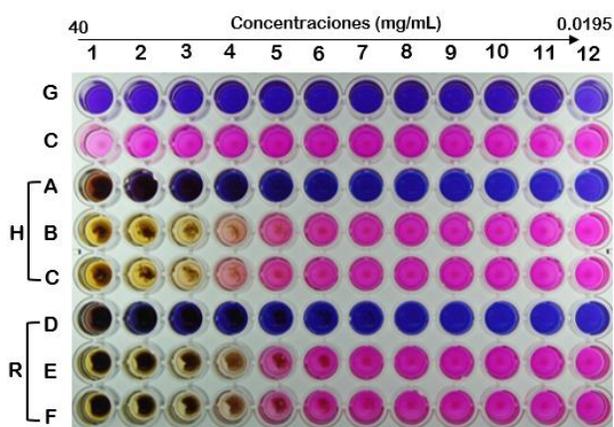
CIM de extracto hexánico contra *S. epidermidis*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. epidermidis*.



CIM de extracto metanólico contra *S. epidermidis*.

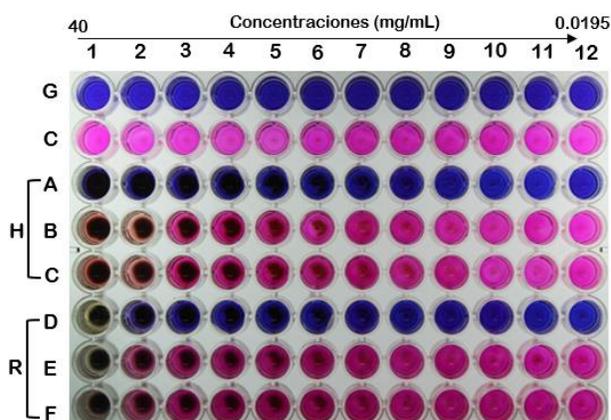


CIM de extracto acuoso contra *S. epidermidis*.

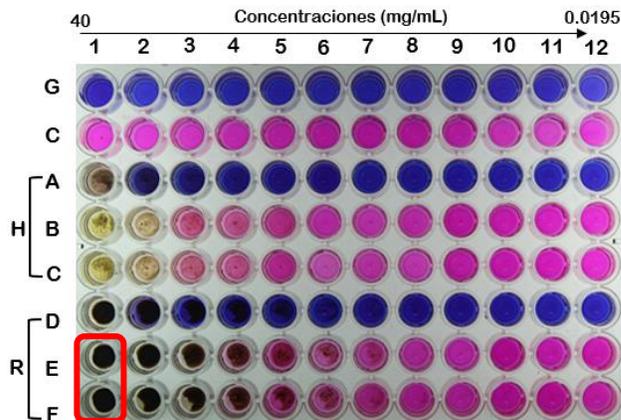
G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

*El recuadro rojo indica el corte de la MIC

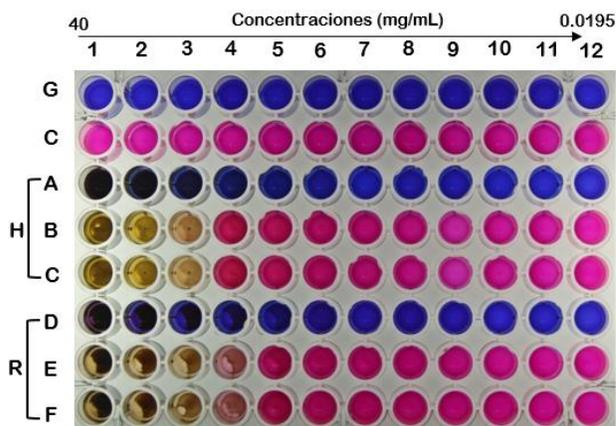
Anexo 7. CIM de extractos de *G. stolzeana* frente a bacterias Gram negativas.



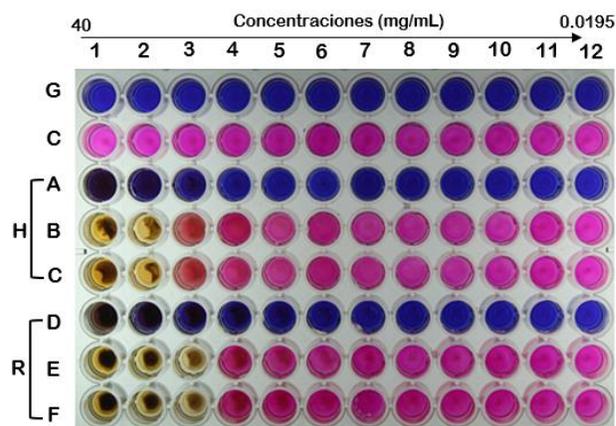
CIM de extracto hexánico contra *E. coli*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *E. coli*.



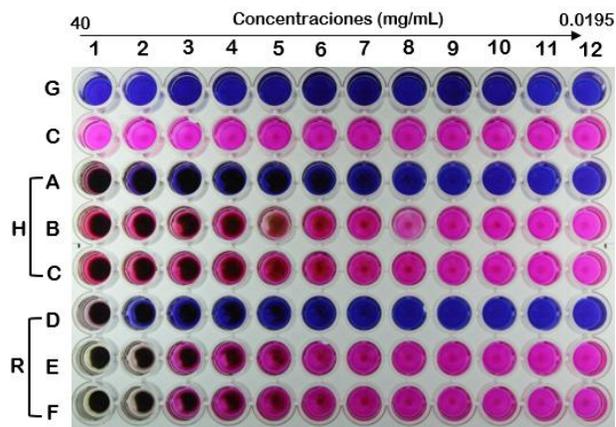
CIM de extracto metanólico contra *E. coli*.



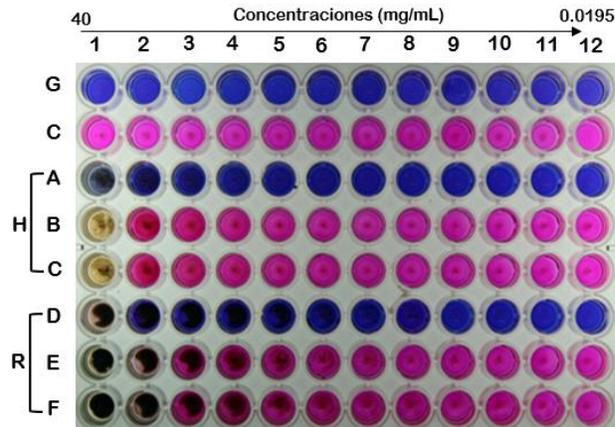
CIM de extracto acuoso contra *E. coli*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizoma+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

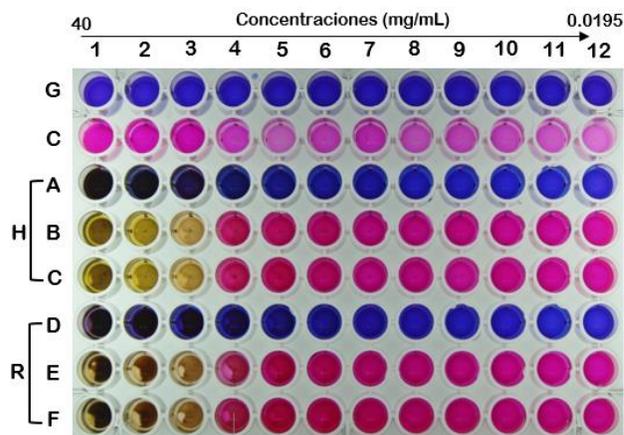
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



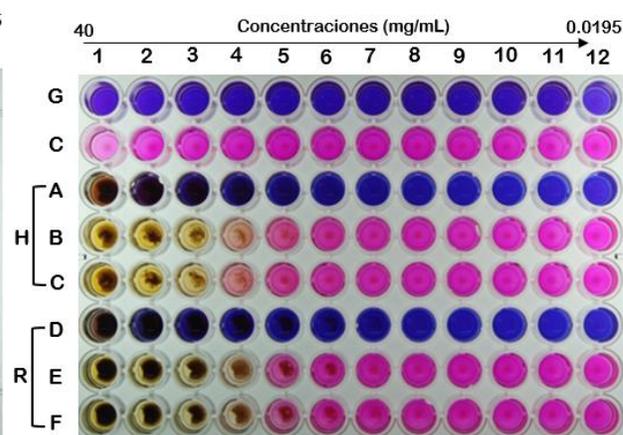
CIM de extracto hexánico contra *E. coli* EPEC



CIM de extracto de acetato de etilo contra *E. coli* EPEC



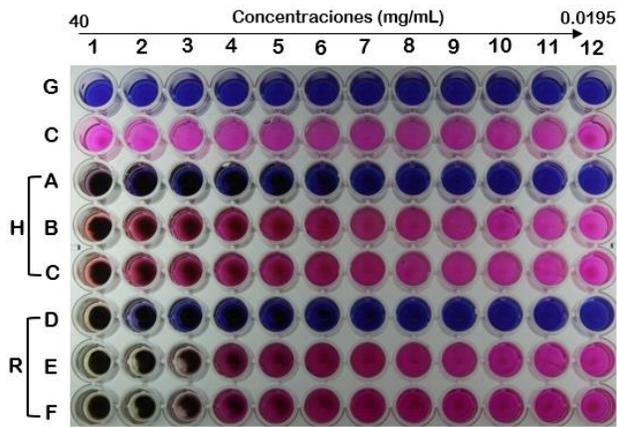
CIM de extracto metanólico contra *E. coli* EPEC



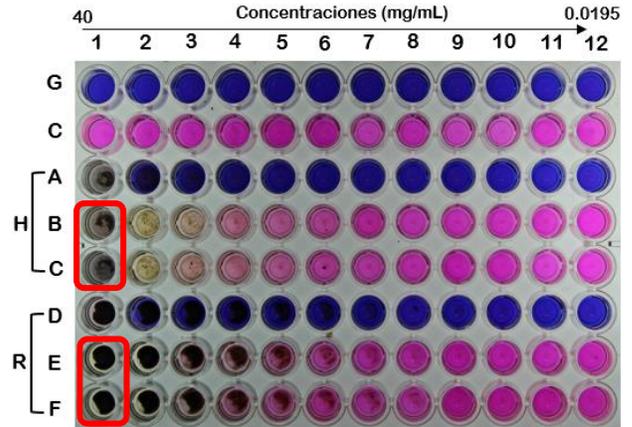
CIM de extracto acuoso contra *E. coli* EPEC

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

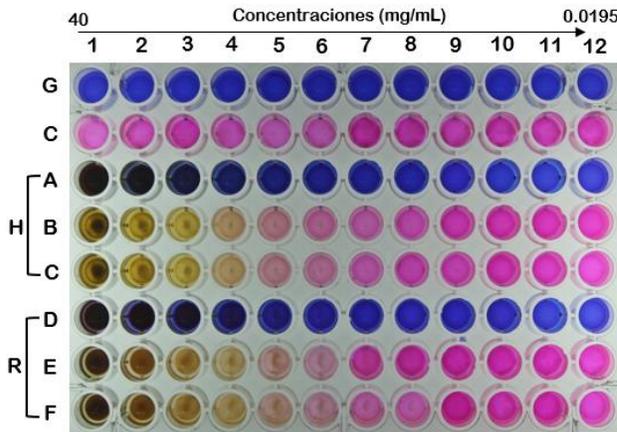
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



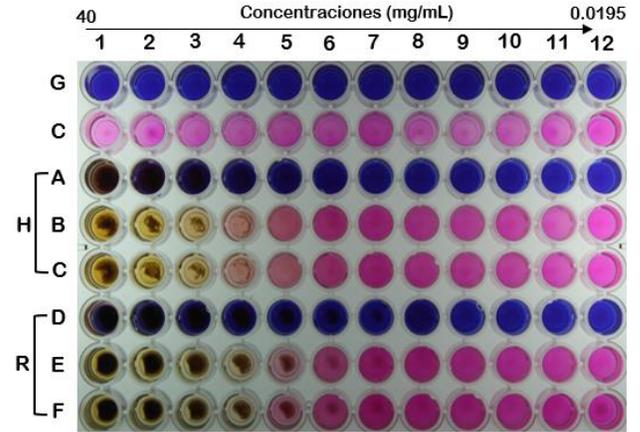
CIM de extracto hexánico contra *S. sonnei*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. sonnei*.



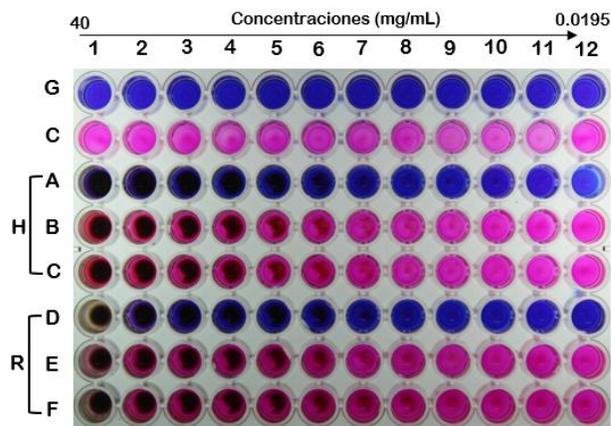
CIM de extracto metanólico contra *S. sonnei*.



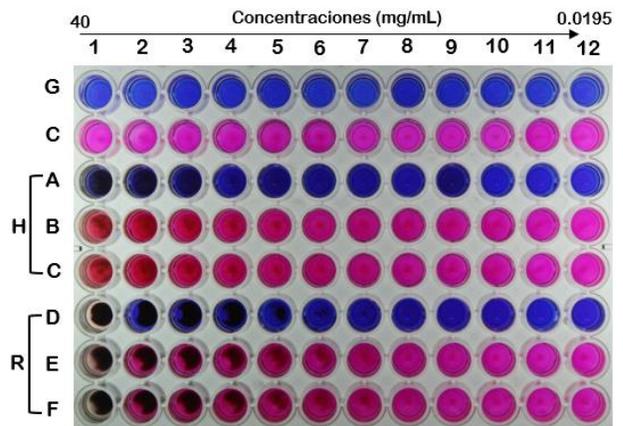
CIM de extracto acuoso contra *S. sonnei*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

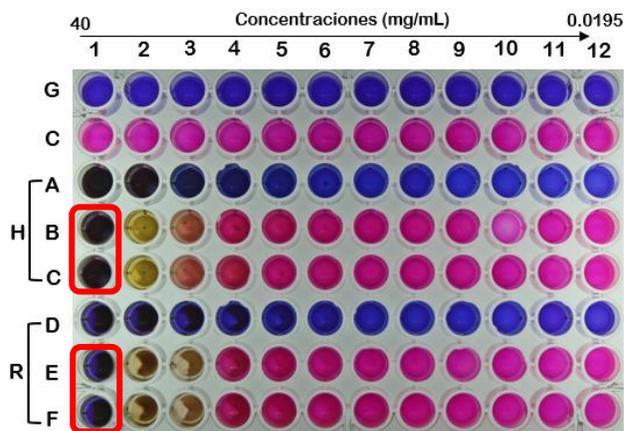
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



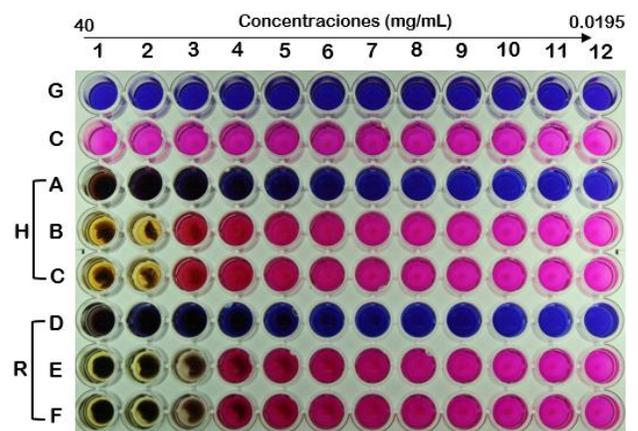
CIM de extracto hexánico contra *S. Typhi*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. Typhi*.



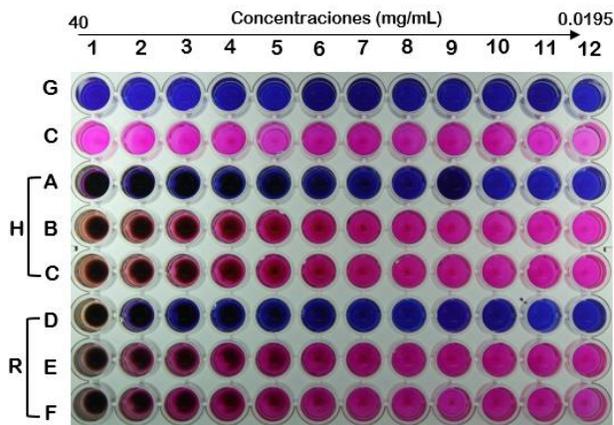
CIM de extracto metanólico contra *S. Typhi*.



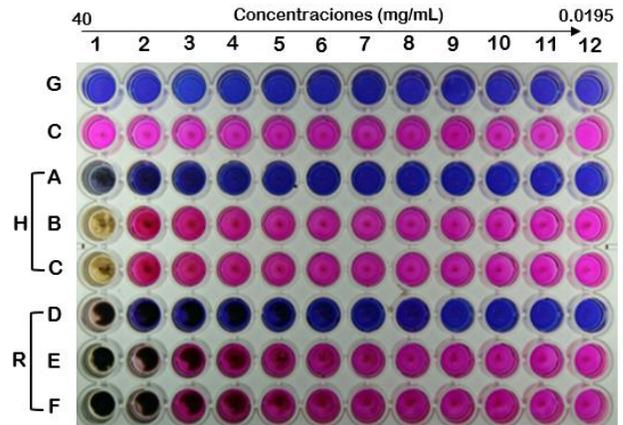
CIM de extracto acuoso contra *S. Typhi*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

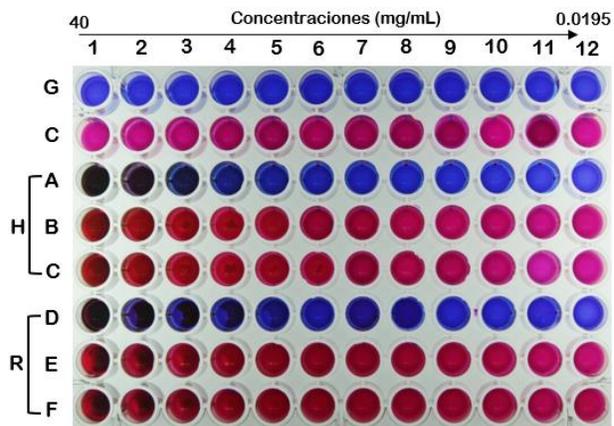
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



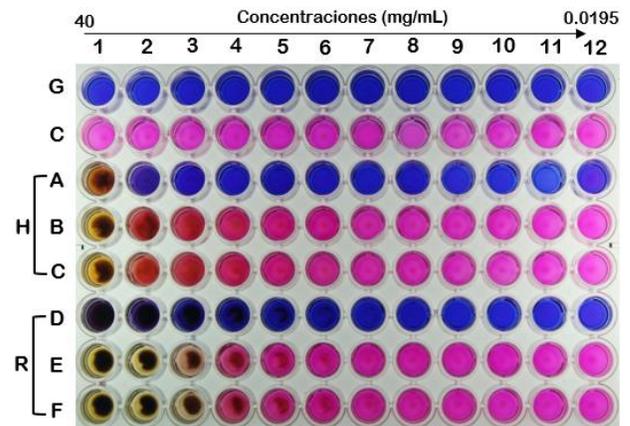
CIM de extracto hexánico contra *P. aeruginosa*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *P. aeruginosa*.



CIM de extracto metanólicos contra *P. aeruginosa*.

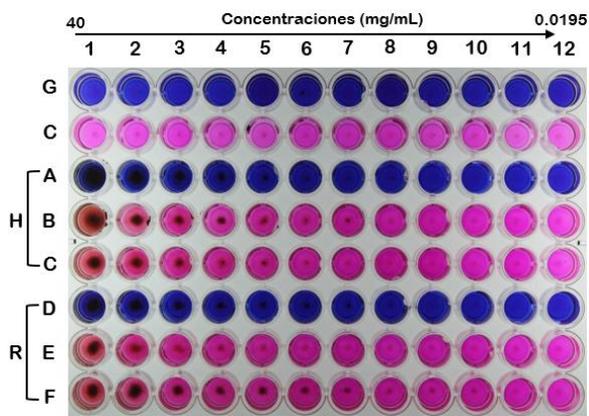


CIM de extracto acuoso contra *P. aeruginosa*.

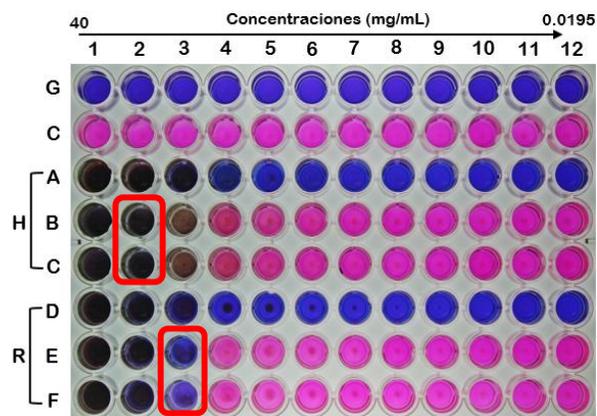
G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

*El recuadro rojo indica el corte de la MIC

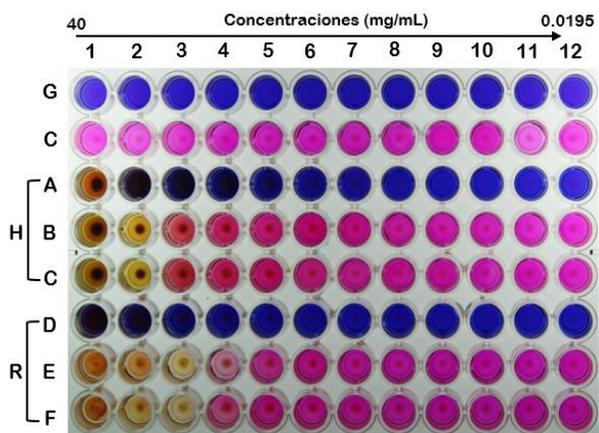
Anexo 8. CIM de extractos de *A. amplum* frente a bacterias Gram positivas.



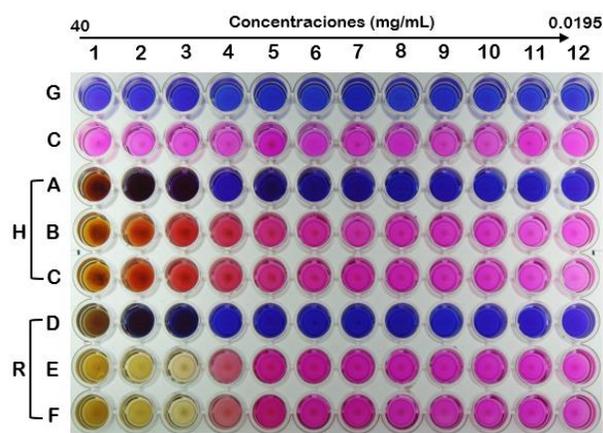
CIM de extracto hexánico contra *S. aureus*



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. aureus*



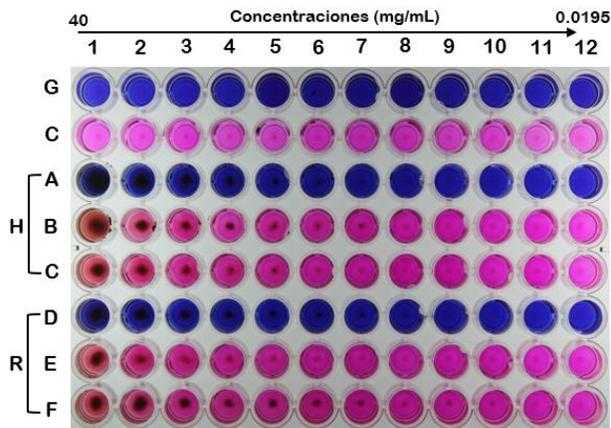
CIM de extracto metanólico contra *S. aureus*



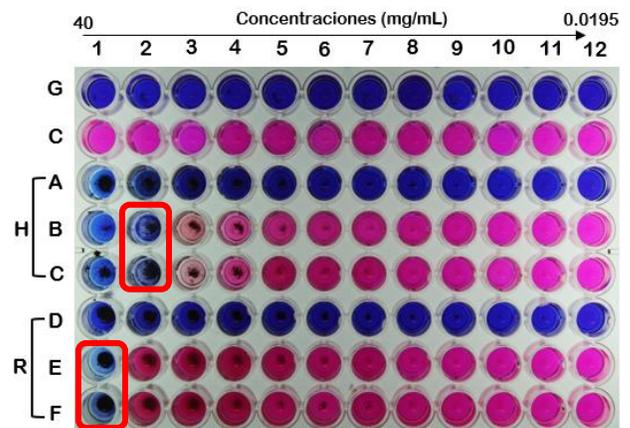
CIM de extracto acuoso contra *S. aureus*

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

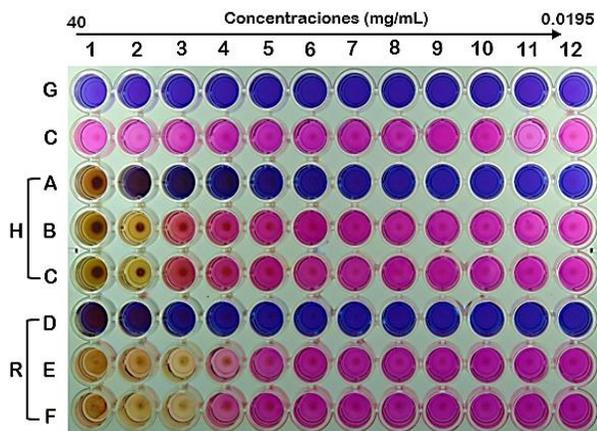
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



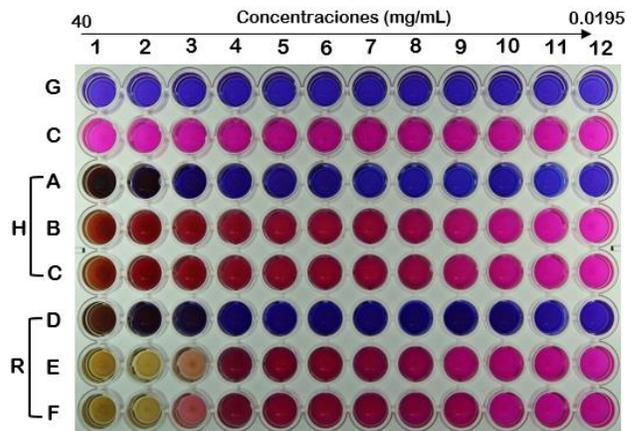
CIM de extracto hexánico contra *S. epidermidis*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. epidermidis*.



CIM de extracto metanólico contra *S. epidermidis*.

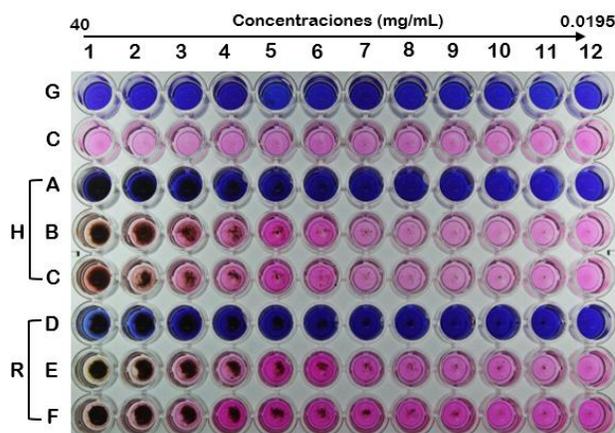


CIM de extracto acuoso contra *S. epidermidis*.

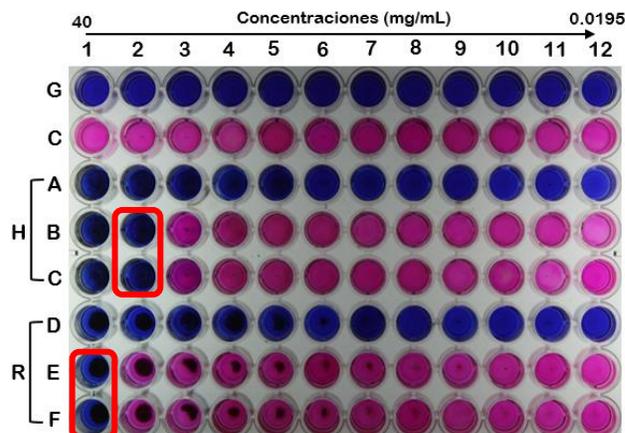
G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

*El recuadro rojo indica el corte de la MIC

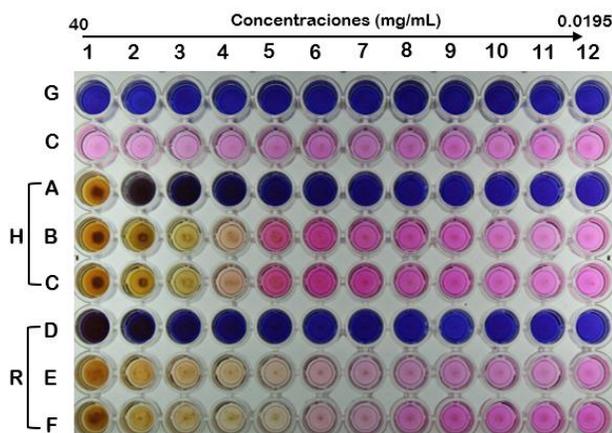
Anexo 9. CIM de extractos de *A. amplum* frente a bacterias Gram negativas



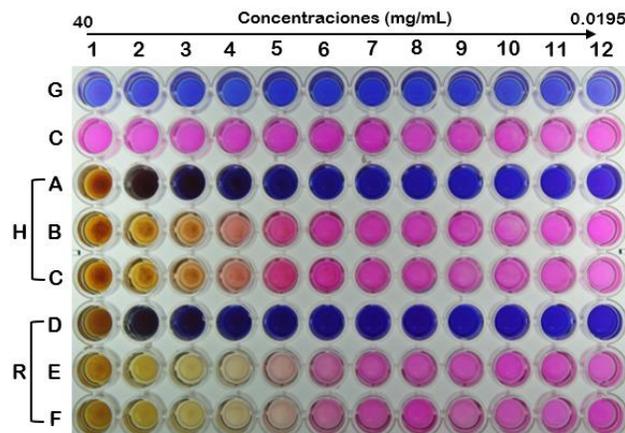
CIM de extracto hexánico contra *E. coli*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *E. coli*.



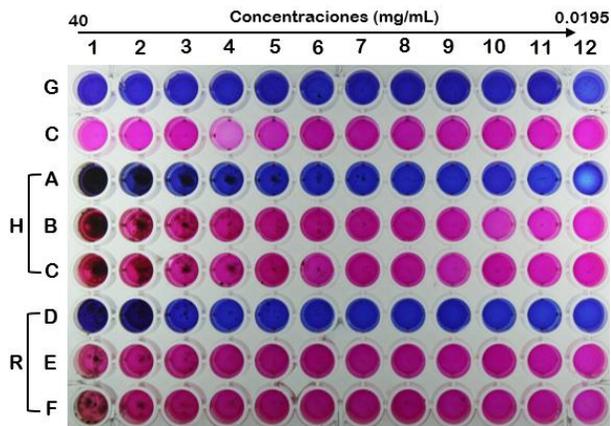
CIM de extracto metanólico contra *E. coli*.



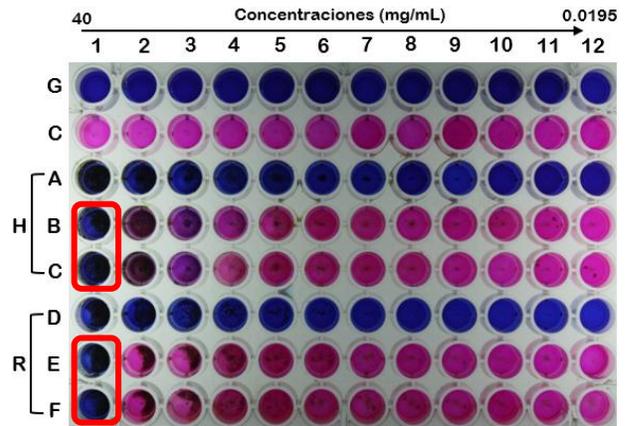
CIM de extracto acuoso contra *E. coli*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

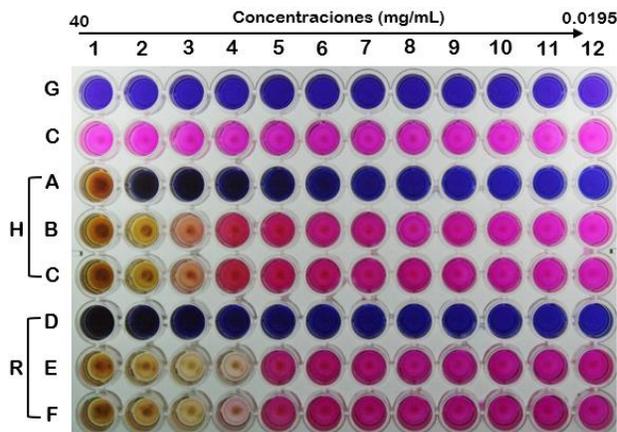
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



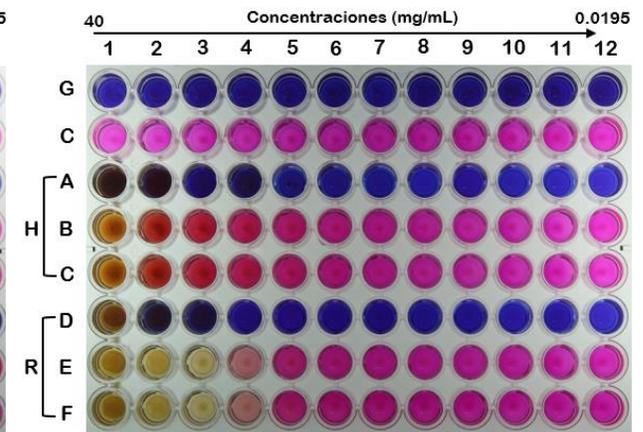
CIM de extracto hexánico contra *E. coli* EPEC



CIM de extracto de acetato de etilo contra *E. coli* EPEC



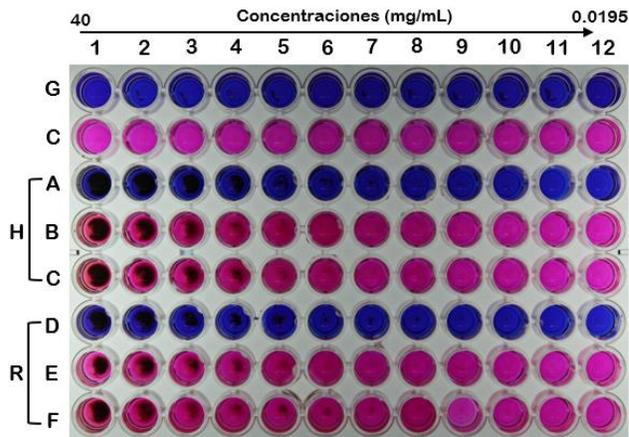
CIM de extracto metanólico contra *E. coli* EPEC



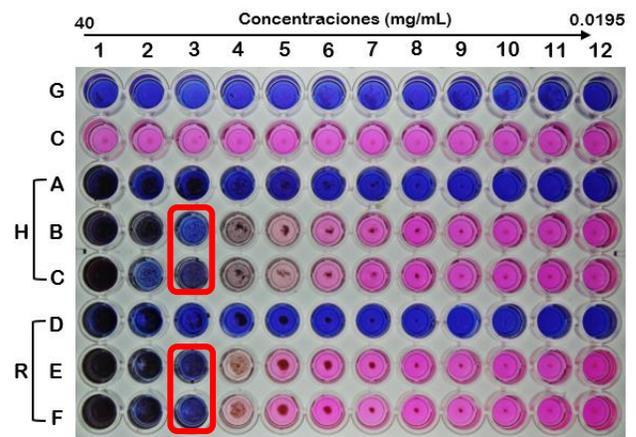
CIM de extracto acuoso contra *E. coli* EPEC

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

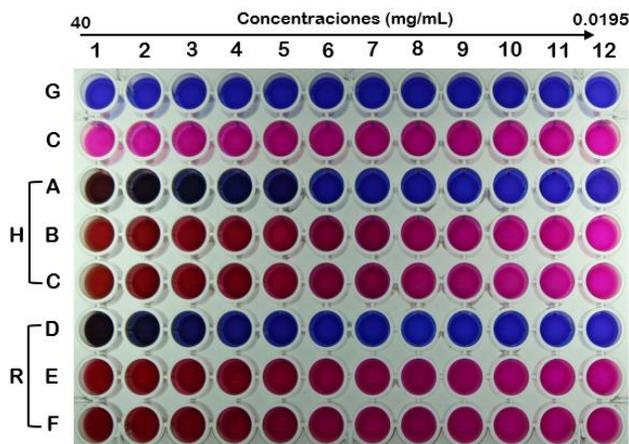
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



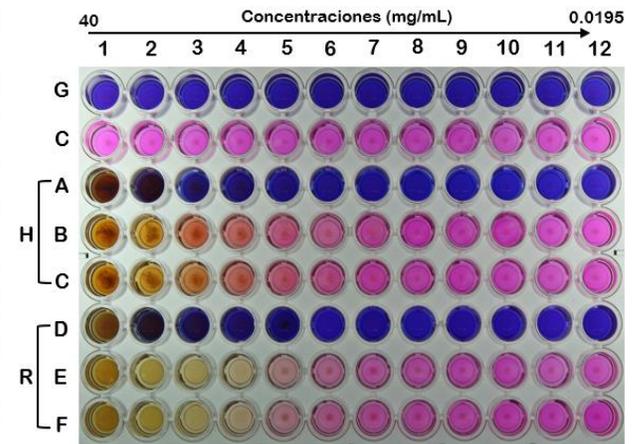
CIM de extracto hexánico contra *S. sonnei*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. sonnei*.



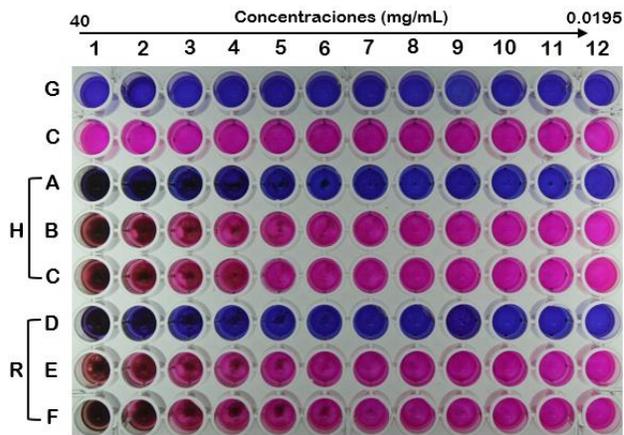
CIM de extracto metanólico contra *S. sonnei*.



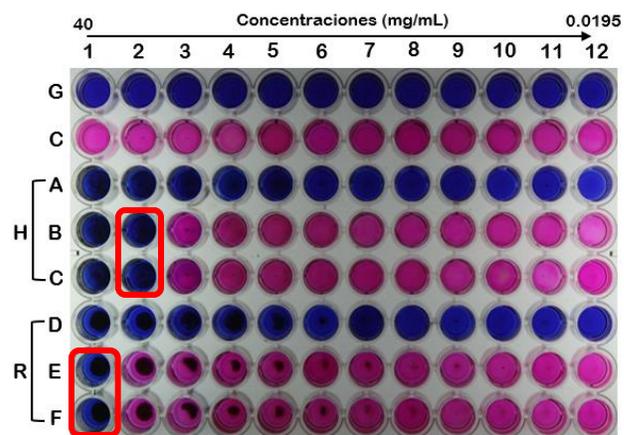
CIM de extracto acuoso contra *S. sonnei*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

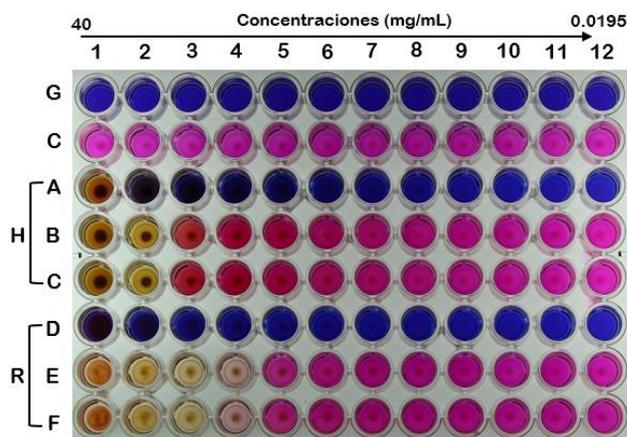
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



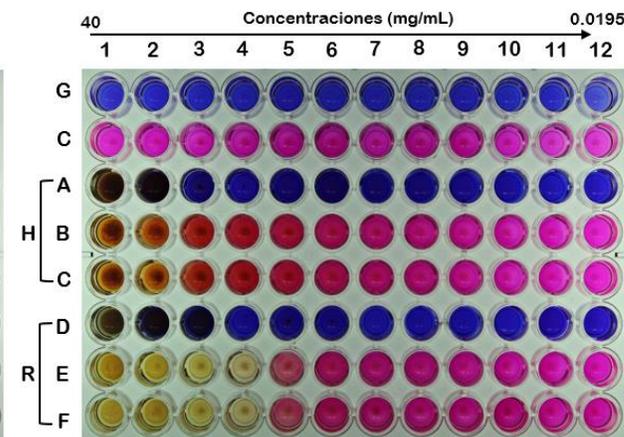
CIM de extracto hexánico contra *S. Typhi*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *S. Typhi*.



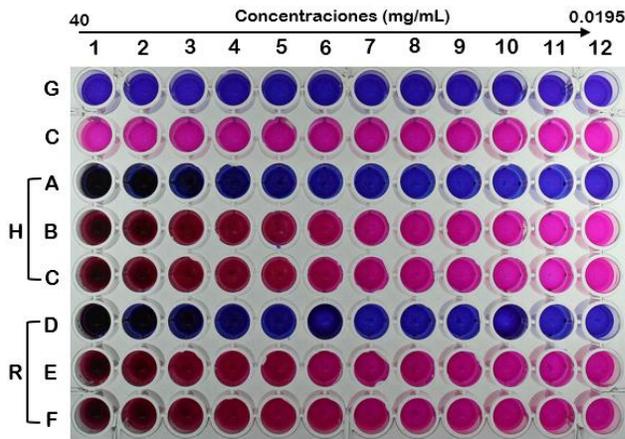
CIM de extracto metanólico contra *S. Typhi*.



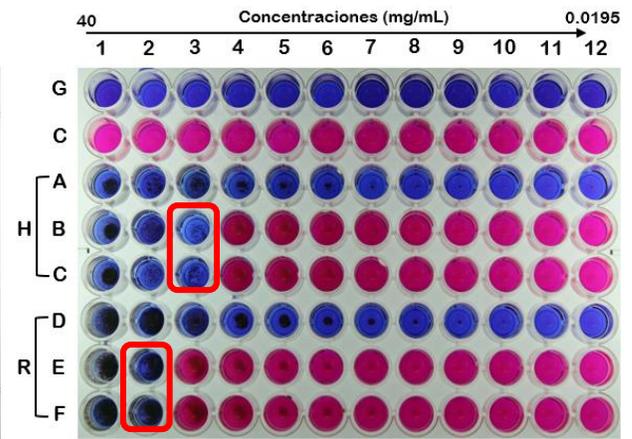
CIM de extracto acuoso contra *S. Typhi*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repeticion 1); C: extracto sobre bacteria (repeticion 2); R: rizomas+raices; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repeticion 1); F: extracto sobre bacteria (repeticion 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

*El recuadro rojo indica el corte de la MIC

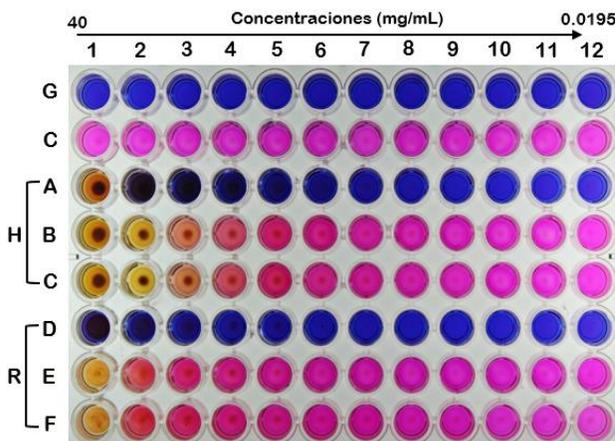


CIM de extracto hexánico contra *P. aeruginosa*.

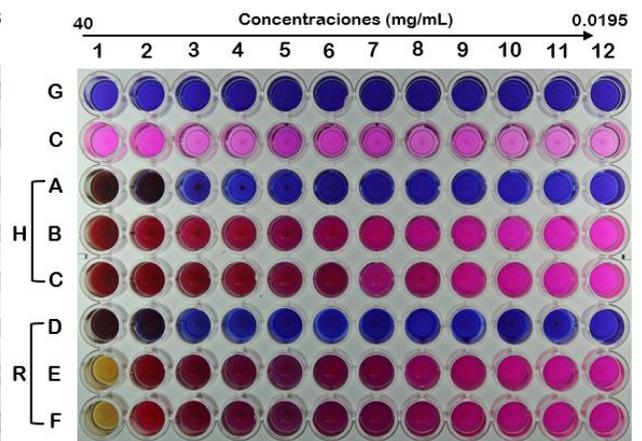


CIM de extracto de acetato de etilo contra

P. aeruginosa.



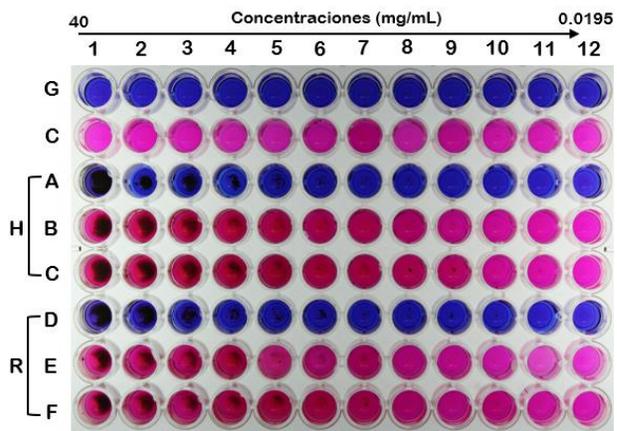
CIM de extracto metanólico contra *P. aeruginosa*.



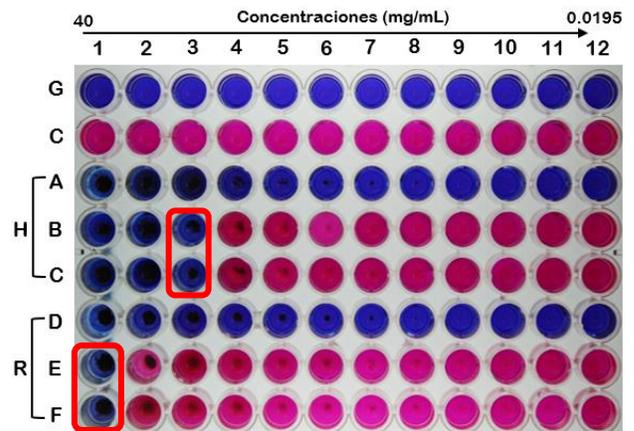
CIM de extracto acuoso contra *P. aeruginosa*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

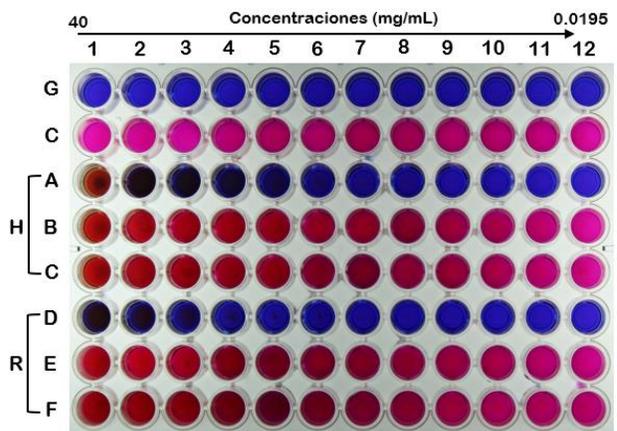
*El recuadro rojo indica el corte de la MIC



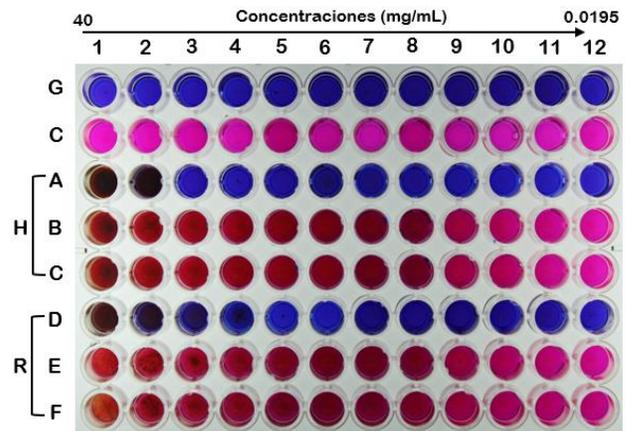
CIM de extracto hexánico contra *K. pneumoniae*.



CIM de extracto de acetato de etilo contra *K. pneumoniae*.



CIM de extracto metanólico contra *K. pneumoniae*.



CIM de extracto acuoso contra *K. pneumoniae*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria e indicador; H: frondas; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); R: rizomas+raíces; D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones (mg/mL): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195.

*El recuadro rojo indica el corte de la MIC

Anexo 10. Análisis estadístico de ANOVA Multifactorial de *G. stolzeana*.

Análisis de varianza para MIC de *G. stolzeana*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Bacteria	1.00926	8	0.126157	4.45	0.0001
B:Extracto	0.0509259	3	0.0169753	0.60	0.6164
INTERACCIONES					
AB	0.657407	24	0.027392	0.97	0.5111
RESIDUOS	23.5	828	0.0283816		
TOTAL (CORREGIDO)	25.2176	863			

Prueba para múltiple rangos para MIC por extractos

Extracto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
AcOEt frondas	216	0.0185185	0.0114628	X
MeOH RiRa	216	0.0277778	0.0114628	X
MeOH frondas	216	0.037037	0.0114628	X
AcOEt RiRa	216	0.037037	0.0114628	X

Prueba de múltiple rangos para MIC por bacterias

Bacteria	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<i>E. coli</i> EPEC	96	0	0.0171942	X
<i>P. aeruginosa</i>	96	0	0.0171942	X
<i>K. pneumoniae</i>	96	0	0.0171942	X
<i>B. subtilis</i>	96	0	0.0171942	X
<i>E. coli</i>	96	0.0208333	0.0171942	XX
<i>S. Typhi</i>	96	0.0416667	0.0171942	XX
<i>S. sonnei</i>	96	0.0416667	0.0171942	XX
<i>S. aureus</i>	96	0.0625	0.0171942	XX
<i>S. epidermidis</i>	96	0.104167	0.0171942	X

Anexo 11. Análisis estadístico de ANOVA Multifactorial de *A. amplum*.

Análisis de varianza para MIC de *A. amplum*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Bacteria	0.592593	8	0.0740741	0.95	0.4715
B:Extracto	6.18519	3	2.06173	26.54	0.0001
INTERACCIONES					
AB	1.48148	24	0.0617284	0.79	0.7466
RESIDUOS	64.3333	828	0.0776973		
TOTAL (CORREGIDO)	72.5926	863			

Prueba para múltiple rangos para MIC por extractos.

Extracto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
MeOH RiRa	216	0	0.018966	X
MeOH frondas	216	0.0185185	0.018966	X
AcOEt RiRa	216	0.157407	0.018966	X
AcOEt frondas	216	0.194444	0.018966	X

Prueba de múltiple rangos para MIC por bacterias

Bacteria	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<i>E. coli</i> EPEC	96	0.0416667	0.028449	X
<i>E. coli</i>	96	0.0625	0.028449	XX
<i>K. pneumoniae</i>	96	0.0833333	0.028449	XX
<i>S. epidermidis</i>	96	0.0833333	0.028449	XX
<i>P. aeruginosa</i>	96	0.104167	0.028449	XX
<i>S. aureus</i>	96	0.104167	0.028449	XX
<i>S. Typhi</i>	96	0.104167	0.028449	XX
<i>B. subtilis</i>	96	0.125	0.028449	X
<i>S. sonnei</i>	96	0.125	0.028449	X

Anexo 12. Prueba de toxicidad de los extractos de *G. stolzeana* y *A. amplum*.

Extracto	CL		Desviación estándar	GI	Valor-P		
	50	100					
<i>G. stolzeana</i>	Frondas	Hex	1 012.13	4 410.84	1.69	1	0.1927
		AcOEt	939.01	3122.52	3.77	1	0.052
		MeOH	1 826.47	7 754.68	0.51	1	0.4722
		Acuoso	1 543.62	5 318.13	1.28	1	0.2572
	Ri+Ra	Hex	203.75	1 875.84	5.40	1	0.02
		AcOEt	487.21	1 341.19	16.16	1	0.0001
		MeOH	1 940.62	7 284.08	0.59	1	0.4422
		Acuoso	2 044.57	7 378.22	0.57	1	0.4499
<i>A. amplum</i>	Frondas	Hex	645.26	2 997.04	3.56	1	0.0589
		AcOEt	214.59	749.30	13.62	1	0.0002
		MeOH	1 412.72	5 568.9	1.05	1	0.3046
		Acuoso	1 967.34	7 401.95	0.57	1	0.4497
	Ri+Ra	Hex	177.57	530.68	15.30	1	0.0001
		AcOEt	165.57	494.00	15.22	1	0.0001
		MeOH	1 365.85	4 801.73	1.47	1	0.2247
		Acuoso	1 047.26	3 630.14	2.70	1	0.0998