



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

---

## CAMPUS TUXTEPEC

**Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Rhoeo discolor*  
sobre bacterias y levaduras de importancia clínica  
mediante microdilución y CCF-bioautografía**

**Tesis que presenta:**

**Abril Crisálida Díaz Toral**

**Para obtener el título de  
Ingeniero en Biotecnología**

**Director de tesis:**

**Dra. Jacqueline Capataz Tafur**

**Co-Director de tesis:**

**Dr. Lemuel Pérez Picaso**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. 2017**

*No esperes que todo el mundo te  
entienda, especialmente si nunca  
han tenido que recorrer tu  
camino.*

## AGRADECIMIENTOS

### **A mis padres por darme la vida.**

**A Dios** por permitirme tener el amor, apoyo y disfrutar a mi familia. **A mi padre** por apoyarme toda la vida, por todo su esfuerzo, cariño, confianza y comprensión. **A mi Abuela (+) y mi tía** por ser la razón para nunca rendirme, por todo su amor, apoyo y estar siempre a mi lado, y por lo más importante, ser más que una madre. **A mis tíos** por todo su apoyo, confianza, por ser un buen ejemplo y por todo su cariño. **A mi familia** por creer en mí y nunca dejarme sola.

Un enorme y sincero agradecimiento a la **Dra. Jacqueline Capataz Tafur**, por su confianza, por toda su paciencia, apoyo y dedicación, como directora de tesis en este trabajo. A mi Co-Director el **Dr. Lemuel Pérez Picaso**, por todo su apoyo y dedicación.

Al comité revisor de tesis, **Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**, **Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo** y **Dra. Janet María León Morales**, un sincero y gran agradecimiento por todo su apoyo y tomarse un espacio en la revisión del trabajo, aun teniendo mil cosas por hacer.

A todos los que colaboraron directa e indirectamente en este camino, a mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, compañeros de carrera, a mis mejores y hermosas amigas **Viry** y **Marly** por toda su amistad y apoyo. **A Abi** por todo su apoyo, amistad y amor en los momentos buenos, malos y difíciles.

## RECONOCIMIENTO



Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales y Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la Dirección de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur y Co-Dirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso.

La investigación fue realizada con el financiamiento proyecto de Ciencia Básica del CONACyT CB 2012-01 N° 183958: Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Rhoeo discolor* sobre bacterias y levaduras de importancia clínica mediante microdilución y CCF-bioautografía y el proyecto INFR201501 N° 255514: Equipamiento para fortalecer la investigación en Cultivo de Tejidos y Producción de Metabolitos Secundarios Vegetales de la Universidad del Papaloapan.





# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca a 23 de Agosto del 2017.  
**Oficio No. JCIB/198/17**

**Lic. Yessenia Barrientos Arenal**  
**Jefa de Servicios Escolares**

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la **impresión** del trabajo de tesis del alumno **Abril Crisálida Díaz Toral** titulado **"Actividad antimicrobiana de extractos de *Rhoeo discolor* sobre bacterias y levaduras de importancia clínica mediante microdilución y CCF-bioautografía"**. Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

**Atentamente**  
*terra uberrima, mens aperta*  
*Bou Lo-tama, chí jí jú*

**Dra. Ana Karin Navarro Martínez**  
**Jefe de Carrera de**  
**Ingeniería en Biotecnología**



**JEFATURA DE INGENIERIA  
EN BIOTECNOLOGIA  
CAMPUS TUXTEPEC**

c.c.p. M.C. Héctor López Arjona, Vice-Rector Académico, Para su conocimiento.  
c.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Asesor de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Abril Crisálida Díaz Toral, Alumno, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

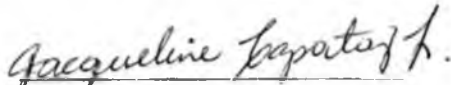
En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 24 de Agosto del 2017 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Actividad antimicrobiana de extractos de *Rhodo discolor* sobre bacterias y levaduras de importancia clínica mediante microdilución y CCF-bioautografía** presentado por la alumna **Abril Crisálida Díaz Toral**, con número de matrícula **11090007**, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.**


Tuxtepec, Oax., a 24 de Agosto del 2017.

ATENTAMENTE,  
LA COMISIÓN REVISORA

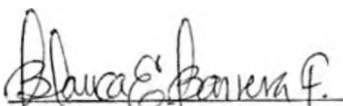
Director de Tesis

  
Dra. Jacqueline Capataz Tafur  
Profesor- Investigador


Co-Director de Tesis

  
Dr. Lemuel Pérez Picaso  
Profesor- Investigador


Presidente

  
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa  
Profesor- Investigador

Secretario

  
Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo  
Profesor-Investigador

Vocal

  
Dra. Janet María León Morales  
Profesor- Investigador

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Enfermedades infecciosas y su importancia .....	5
2.2 Uso de Antibióticos y Antifúngicos .....	6
2.2.1 Antibióticos .....	7
2.2.2 Antifúngicos o antimicóticos.....	8
2.3 Importancia de las plantas medicinales .....	9
2.4 Las plantas como fuente de agentes antimicrobianos.....	10
2.5. <i>Rhoeo discolor</i> .....	13
2.5.1 Botánica.....	14
2.5.2 Usos medicinales y actividad biológica.....	15
2.6 Métodos de detección de Actividad antimicrobiana .....	17
2.6.1 Método de difusión en agar (Kirby Bauer) .....	17
2.6.2 Método de dilución en agar .....	17
2.6.3 Método de dilución y microdilución en caldo .....	17
2.6.4 Concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida o fúngica .....	18
2.7 Métodos de análisis fitoquímicos .....	19
2.7.1 Fitoquímica cualitativa .....	19
2.7.2 Cromatografía capa fina (CCF).....	19
2.8 Bioautografía.....	20
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4 JUSTIFICACIÓN.....	23
5 HIPOTESIS.....	24
6 OBJETIVOS.....	25
6.1 Objetivo general.....	25
6.2 Objetivos particulares.....	25

7	METODOLOGÍA.....	26
7.1	Diagrama Experimental.....	26
7.2	Material biológico .....	27
7.2.1	Bacterias y levaduras de origen clínico y de referencia.....	27
7.2.2	Material vegetal.....	28
7.3	Preparación de los extractos.....	29
7.4	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>R. discolor</i> .....	30
7.5	Concentración mínima inhibitoria, Concentración mínima bactericida y fúngica. .....	33
7.6	TLC-Bioautografía.....	34
7.6	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) .....	36
7.7	Análisis estadístico.....	36
8.	RESULTADOS Y DISCUSION .....	37
8.2	Análisis fitoquímico preliminar de los extractos.....	38
8.3	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>R. discolor</i> .....	40
8.4	Cromatografía en capa fina y CCF-Bioautografía .....	45
8.5	Análisis químico del extracto con mayor actividad biológica.....	49
8.5.1	Determinación de fenoles totales.....	49
8.5.2	Determinación de flavonoides totales .....	50
8.6	Detección de compuestos fenólicos por CLAR .....	50
9.	CONCLUSIONES.....	53
10.	REFERENCIAS .....	54
11.	ANEXOS.....	62

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Extractos de plantas con actividad antimicrobiana .....	11
<b>Cuadro 2.</b> Principales clases de compuestos antimicrobianos de plantas .....	12
<b>Cuadro 3.</b> Actividad antimicrobiana de diferentes extractos de <i>R. discolor</i> .....	16
<b>Cuadro 4.</b> Microorganismos de prueba .....	27
<b>Cuadro 5.</b> Pruebas fitoquímicas preliminares .....	30
<b>Cuadro 6.</b> Características organolépticas de los extractos crudos de <i>R. discolor</i> .....	37
<b>Cuadro 7.</b> Porcentaje de rendimiento de los extractos .....	37
<b>Cuadro 8.</b> Tamizaje fitoquímico de los extractos de <i>R. discolor</i> .....	38
<b>Cuadro 9.</b> Porcentajes de inhibición de la actividad antimicrobiana de bacterias y levaduras .....	41
<b>Cuadro 10.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias, bactericidas o fúngicas, del extracto metanólico y acuoso .....	44
<b>Cuadro 11.</b> R <sub>f</sub> de las bandas encontradas mediante cromatografía en Capa Fina de los extractos de <i>R. discolor</i> .....	46
<b>Cuadro 12.</b> Inhibición de crecimiento en TLC-Bioautografía de los extractos metanólico y acuoso .....	48
<b>Cuadro 13.</b> Concentración de fenoles totales en los extractos bioactivos de <i>R. discolor</i> .....	49
<b>Cuadro 14.</b> Concentración de flavonoides totales en extractos bioactivos de <i>R. discolor</i> .....	50

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de los antibióticos.....	8
<b>Figura 2.</b> Distribución de <i>R. discolor</i> en la República Mexicana.....	14
<b>Figura 3.</b> Planta de <i>R. discolor</i> .....	14
<b>Figura 4 .</b> Ubicación geográfica de la recolección.....	28
<b>Figura 5.</b> Diseño de la microplaca utilizado para el ensayo de microdilución.....	33
<b>Figura 6.</b> Cromatografía en capa fina de los extractos de <i>R. discolor</i> .....	45
<b>Figura 7.</b> CCF-Bioautografía de los extractos metanólico y acuoso de <i>R. discolor</i> .....	47
<b>Figura 8</b> Cromatograma HPLC de los extractos metanolico y acuoso de <i>R. discolor</i> .....	51

## GLOSARIO DE TERMINOS

CLAR: Cromatografía líquida de Alta Resolución

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMB: Concentración Mínima Bactericida

CCF: Cromatografía en Capa Fina

°C: Grados centígrados

DMSO: Dimetilsulfóxido

mL: mililitros

mg: miligramos

µg: microgramos

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

ATCC: American Type Culture Collection

CBS: The Convention of Biological Diversity

AC: Aislado clínico

ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

MH: Mueller Hinton

SDA: Saboraud Dextrosa Agar

OMS: Organismo Mundial de la Salud

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico

EQ: Equivalentes de Quercetina

## RESUMEN

*Rhoeo discolor* (*Commelinaceae*), comúnmente conocido como maguey morado es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana. Se le han atribuido propiedades como antiparasitarias, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, antigenotóxica y antioxidante. Sin embargo, se desconoce cuáles son los principales metabolitos secundarios y/o compuestos responsables en particular de la actividad antimicrobiana así como la concentración mínima inhibitoria para aplicar dichos extractos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *R. discolor* contra microorganismos patógenos humanos mediante la técnica de microdilución y CCF-Bioautografía. Se obtuvieron 5 extractos *R. discolor* y se evaluó la actividad antimicrobiana. Los extractos metanólico y acuoso mostraron la alta actividad ( $\geq 50\%$ ) frente a 6 bacterias y 4 levaduras. Ambos extractos mostraron alta sensibilidad con valores CMI de 0.8 mg/mL contra *S. typhi* ATCC 6539 y de 3.2 mg/mL contra *C. glabrata*. El análisis de bioautografía de los extractos metanólico y acuoso revelaron al menos 9 componentes antibacterianos, mientras que se encontraron 5 componentes anti fúngicos con diferentes zonas de inhibición. Dadas las propiedades de solubilidad de los extractos activos, los fenoles pueden comprender la mayoría de los compuestos antibacterianos activos de *R. discolor*, los cuales fueron cuantificados mediante colorimetría y detectados por CLAR. Este trabajo demostró la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *R. discolor*.

**Palabras clave:** Planta medicinal, *R. discolor*, actividad antimicrobiana, patógenos clínicos.

## ABSTRACT

*Rhoeo discolor* (Commelinaceae) commonly known as purple maguey is a plant used in traditional Mexican medicine. It has been attributed properties as antiparasitic, antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory, antigenotoxic and antioxidant. However, the major secondary metabolites and/or compounds responsible for antimicrobial activity and the minimal inhibitory concentration for applying said extracts are unknown. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of leaves extracts of *R. discolor* against human pathogenic microorganisms, using the microdilution technique and TLC-Bioautography. Five *R. discolor* extracts were obtained and the antimicrobial activity was evaluated. The methanolic and aqueous extracts showed high activity ( $\geq 50\%$  of inhibition) against 6 bacteria and 4 yeasts. Both extracts showed high sensitivity with MIC values of 0.8 mg/mL against *S. tphi* ATCC 6539 and 3.2 mg/mL against *C. glabrata*. TLC-Bioautography analysis of the methanolic and aqueous extracts revealed at least nine antibacterial components and five antifungal components with different zones of inhibition. Given the solubility properties of the active extracts, the phenols may comprise most of the active *R. discolor* antimicrobial compounds, which were quantified by colorimetry and HPLC. This work demonstrated systemically the antimicrobial activity of leaves extracts of *R. discolor*.

**Keywords:** Medicinal plant, *Rhoeo discolor*, microdilution assay, TLC-bioautography

## 1. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una amplia biodiversidad de especies vegetales, en números esto es expresado en 30,000 a 50,000 plantas con potencial de tipo terapéutico. Sin embargo de esta cantidad solo se ha estudiado y caracterizado al menos el 5% de las plantas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina alternativa representa la única opción para las personas que no cuentan con los recursos necesarios para adquirir un servicio médico o medicamentos que alivien sus malestares, es por eso que ellos acuden al uso de plantas, al menos el 60 % de la población mundial (OMS,2015)

Se considera una planta medicinal a aquella que en algunos de sus órganos contenga sustancias con posible actividad farmacológica que pueda ser utilizada para fines terapéuticos. Esas sustancias con tales actividades pertenecen al metabolismo secundario de la planta, es decir, que cumple con funciones no esenciales en ellas. Debido a distintos tipos de estímulos provenientes a distintos tipos de estrés biótico o abiótico, de esta forma la planta produce metabolitos secundarios responsables de algún tipo de actividad biológica.

Es necesario que una planta medicinal con fines farmacológicos debe ser validada conforme a distintos procedimientos. Estos consisten en una serie de pruebas tanto fitoquímicas como toxicológicas y de pruebas in vitro e in vivo, aprobando así su eficacia y seguridad. Los perfiles fitoquímicos se realizan para identificar los tipos de compuestos que contiene la planta, para posteriormente identificar el compuesto activo responsable de alguna actividad biológica, estas son corroboradas por pruebas del tipo microbiológicas, el análisis fitoquímico va acompañado de análisis toxicológicos, esto para evaluar la eficacia y seguridad del uso de la planta. Finalmente se realizan pruebas in vivo utilizando modelos biológicos y pruebas clínicas. (Villar-López, 2001).

Una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, endémica del país es, *Rhoeo discolor*, conocida comúnmente como maguey morado o arca de Noé. Se le utiliza en la medicina tradicional como agente desinflamatorio, en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, para cicatrizar heridas, y como antigripal. Estudios realizados en esta planta le han atribuido propiedades como antiparasitarias, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, antigenotóxica y antioxidante, esto debido a que en su composición fitoquímica se encuentran metabolitos de tipo flavonoides y compuestos cumáricos, responsables de las propiedades de esta planta (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2015). Sin embargo, se desconoce cuáles son los principales metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria para aplicar dichos extractos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Rhoeo discolor* mediante la técnica de microdilución y TLC-Bioautografía sobre bacterias y levaduras de importancia clínica.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedades infecciosas y su importancia

Las enfermedades infecciosas son todas aquellas patologías que se manifiestan por una infección provocada por un microorganismo. Entre los agentes patógenos involucrados se encuentran las bacterias, hongos o levaduras, y en algunas ocasiones virus. Este tipo de enfermedades pueden ser transmitidas por vía oral, consumo de agua, y alimentos contaminados, cabe destacar que la población infantil es la que se ve más afectada. Representan un problema importante de salud y son una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en México (Hernández, 2011).

Mundialmente, las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de mortalidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar a 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales. Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes. Los cuadros gastrointestinales pueden presentarse en cualquier época del año, pero el riesgo de sufrir estas enfermedades se incrementa en la temporada de calor (García-Sánchez, 2013).

La salmonelosis es causada por *Salmonella typhi*, de la que existen más de 2 500 serotipos. Uno de los serotipos aislados en México más frecuente se encuentra *Typhimurium* (Gutiérrez-Cogco, 2000). Constituye una de las causas de gastroenteritis en la población de bebés y niños. Los estados en los que se ha reportado mayor índice de casos son: Oaxaca, Tabasco, Coahuila, Chiapas y Sinaloa (Salud y Lii, 2012). Una estimación de casos de fiebre tifoidea al año es de al menos 16 millones, con una cantidad aproximada en muertes de 6 millones y 1,300 de casos de gastroenteritis (Figueroa Ochoa y Verdugo Rodríguez, 2005).

Por otra parte, la Shigelosis es endémica de climas tropicales y templados. Lamentablemente los países en vías de desarrollo son los más afectados. La más frecuente es causada por la bacteria *Shigella flexneri*, con un 60% de aislamientos, en nuestro país causa al menos el 11% de frecuencia en enteropatías. La población más vulnerable son los niños menores de 10 años de edad, causándoles falla renal y llegando a causar la muerte si no es tratado a tiempo (Roy Subarna, 2006).

*Escherichia coli* por su parte es causante de diversos tipos de padecimientos tales como: enterotoxigénicos, enteropatogénico y enterohemorrágico, estos se presentan debido a la cantidad de aguas residuales que se encuentran cerca de los lugares poblados. La frecuencia del aislamiento de esta bacteria es de un 30% y la infección de igual forma afecta en su mayoría a niños menores de 5 años y adultos de edad avanzada. En el país, uno de cada cinco niños enfermos de diarrea es por causa de *E.coli* (Estrada-Garcia *et al.*, 2005).

Oaxaca ocupa el segundo lugar en el país con mayor índice de enfermedades de tipo gastrointestinal (Instituto Nacional de Salud Pública, 2015) .Algunas de las enfermedades de origen microbiano y de importancia médica en país son: Neumonía (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus spp*), Tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), Aspergilosis (*Aspergillus fumigatus*), Enfermedades gastrointestinales (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*), Candidiasis (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*) (Paredes y Roca, 2015).

## **2.2 Uso de Antibióticos y Antifúngicos**

Los antibióticos y los antifúngicos son sustancias que eliminan (bactericidas y fungicidas) o inhiben (bacteriostáticos y fungistáticos) el crecimiento de los microorganismos.

### 2.2.1 Antibióticos

Antibiótico es una palabra derivada de las palabras griegas anti "contra" y Bios "vida". Un antibiótico, también llamado fármaco antimicrobiano, es un medicamento que combate las infecciones causadas por bacterias.

Los antibióticos en la práctica médica se clasifican de acuerdo a su actividad en bactericida y bacteriostática, su efecto sobre bacterias de acuerdo a la composición química de la pared celular (Por tinción de Gram) y de acuerdo a su mecanismo de acción y su estructura química (Camacho, 2010).

Según su actividad:

- Bactericidas: Penicilinas, cefalosporinas, Aminoglucósidos, Rifampicina, quinolonas, Monobactámicos, Poliximinas.
- Bactereostáticos: Tetraciclinas, Eritromicina, Sulfanamida, Novoviocina, Cloranfenicol.

Según el efecto sobre bacterias de acuerdo a la pared bacteriana.

- Bacterias Gram (+): Penicilinas, Glicopéptidos, Lincosamida, Rifampicinas.
- Bacterias Gram (-) Aminoglucósidos, Monobactámicos, Aminociclitoles.

Según se mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana (Figura 1):

- Inhibición de la síntesis de pared celular: Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicina, Fosfomicina, Teicoplanina, Bacitracina.
- Lesión en la permeabilidad de la membrana celular: Polimixinas, Colistinas, Nistatina.
- Inhibición de la síntesis proteica: Cloranfenicol, Tetraciclina, Aminoglucósidos, Lincomicinas, Eritromicina.
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: Quinolonas, Sulfonamidas, Rifampicina, Trimetroprim.

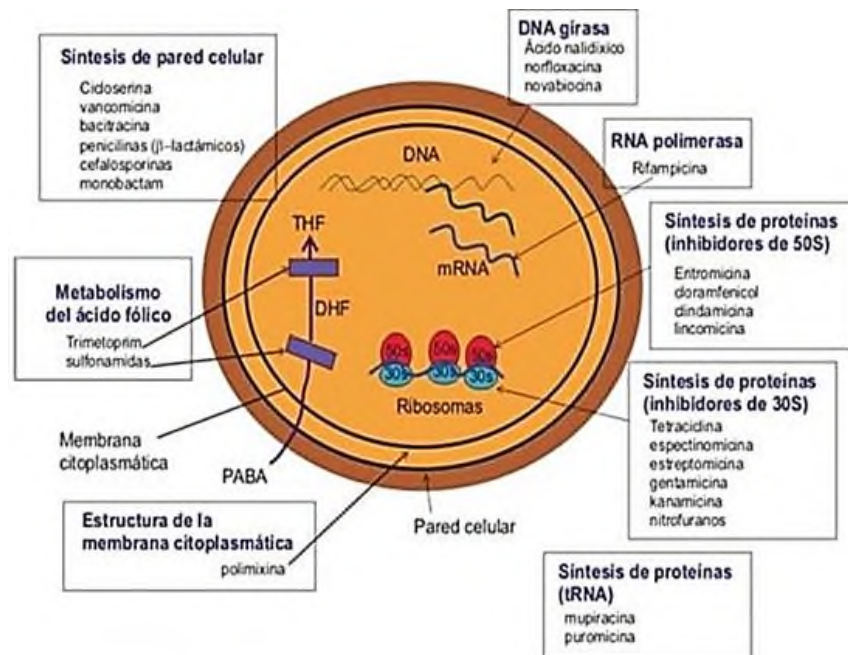


Figura 1. Clasificación de los antibióticos. Tomado de Brock, 1999

### 2.2.2 Antifúngicos o antimicóticos

Los antifúngicos o antimicóticos son moléculas que ayudan a luchar contra los hongos, los cuales causan enfermedades conocidas como micosis. Los hongos microscópicos infectan la piel, las membranas mucosas, el pelo y las uñas. La mayoría de los hongos aprecian las zonas de maceración donde les gusta desarrollarse, porque son calientes y húmedas, propicias para su desarrollo (entre los dedos de los pies, los pliegues de la piel en las personas con sobrepeso, el tracto digestivo). Ciertas formas de antifúngicos son de uso local: cremas, ungüentos, champús o polvos, cuando el área afectada se encuentra disponible, como en el caso de candidiasis, boca, la piel o el cabello en los casos de tiña. Sin embargo, el modo de administración puede ser oral, especialmente en el tratamiento de hongos del tracto digestivo (Grogori, 2005).

Los antifúngicos se clasifican de acuerdo a su composición química del tipo y según su sitio de interacción sobre la célula fúngica (Grogori, 2005)

Según su composición química se clasifican en:

- Polienos: Nistatina, Natamicina, Anfotericina B,
- Azoles: Imidazol: Miconazol, Clotrimazol,
- Triazoles: Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Variconazol, Revuconazol, Alilaminas: Terbinafina, Naftifina, Lipopéptidos: Papulacandinas, Triterpenos glicosilados,
- Equinocandinas: Caspofungina, Anidulofungina, Micafungina,
- Otros: Yoduro de potasio, Ciclopirox, Tolnaftato, Griseofulvin.

Según su sitio de interacción en la célula fúngica en:

- Lipopéptidos: Interactúan con la pared celular,
- Polienos, Azoles Alilaminas: Interactúan con la membrana celular,
- Pirimidinas fluoradas: Interactúan en el núcleo.

Los fármacos antifúngicos más utilizadas para el tratamiento de infecciones por hongos y levaduras, son: Clotrimazol, Fluconazol, Miconazol, Anfotericina B.

### **2.3 Importancia de las plantas medicinales**

A lo largo de la historia, las plantas medicinales han sido parte importante de la cultura de muchos pueblos indígenas, estos adquirieron conocimiento que fue transmitido de generación en generación, mediante el uso de las plantas medicinales utilizado para la cura o tratamiento de diversas enfermedades, lo aplicaban mediante infusiones, aceites, limpias, entre otros. (Cosme-Pérez, 2008).

Se conoce como Medicina Tradicional a todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diversas culturas, usados para el mantenimiento de la salud, para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de distintas enfermedades ya sean del tipo físicas o mentales (OMS,2017). Existen distintas plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de distintos padecimientos, como

gastrointestinales, desinflamatorios, cicatrizantes, antigripales, por mencionar algunos.

Una planta medicinal con fines terapéuticos y que se utiliza en la medicina tradicional, debe de pasar por un proceso de validación, esto consiste en una serie de pruebas a partir de su perfil fitoquímico y farmacológico probando su eficacia y seguridad del mismo. Para esto se realizan pruebas cuantitativas in vitro e in vivo , como un primer paso se realizan perfiles fitoquímicos para identificar el tipo de compuestos que contiene la planta así como el compuesto activo que posteriormente se corroboran con técnicas microbiológicas de sensibilidad del antimicrobiano frente a los microorganismos patógenos, después de esto se realizan test in vivo, llevando un paso más allá a nuestros compuestos activos responsables de alguna actividad biológica, utilizados en modelos biológicos y posteriormente comprobar su éxito en modelos clínicos.

## **2.4 Las plantas como fuente de agentes antimicrobianos**

Desde el comienzo de la historia las plantas y productos vegetales se han utilizado como medicamentos tradicionales (Abu-shanab *et al.*, 2004) se utilizan al menos para la atención primaria de una enfermedad, por esto surge la necesidad de evaluar las actividades biológicas que la medicina tradicional plantea (Onyeagba, 2004). En países en vías de desarrollo alrededor del 70- 95% de los pacientes dependen de los medicamentos naturales, esto debido al alto costo de medicamentos y consultas clínicas especializadas. Del año 2007 al 2012 el mercado de la medicina natural fue de 83 mil millones de dólares y en base anual hay aumento exponencial sobre esta cantidad. Es por eso que existen preocupaciones tanto legales como de salud en la utilización de productos naturales como auto-medicamentos, alimentos funcionales, cuidado de hogares, etc. (Mahmood Ahmad y Mahammad Wajid, 2013). Se han realizado diversas investigaciones en los productos vegetales para verificar sus efectos antimicrobianos (Cuadro 1). De las más de 300,000 especies de plantas que existen, solo alrededor del 2% se le han

comprobado sus propiedades antimicrobianas, más de 157 plantas de han descrito que tienen potenciales propiedades antimicrobianas (Narayan, *et al.*, 2010).

**Cuadro 1.** Extractos de plantas con actividad antimicrobiana

Nombre de la planta	Parte usada	Extracto	Microorganismo de prueba	Referencia
<i>Achyranthus aspera</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lanata cámara</i> y <i>Tagetes patula</i>	Hojas y brotes	Etanólico	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Narayan, <i>et al.</i> , 2010
<i>Prosopis cineraria</i> , <i>Capparis decidua</i> , <i>Tinospora cordifolia</i> , <i>Carissa carandas</i> y <i>Cordia dichotoma</i>	Hojas	Benceno, cloroformo, acetona, metanol y agua	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Candida albicans</i>	Salar y Dhall, 2010
<i>Woodfordia fruticosa</i> , <i>Viburnum cotinifolium</i> , <i>Peganum harmala</i> , <i>Broussonetia papyrifera</i> , <i>Taraxacum officinale</i> , <i>Verbascum thapsus</i> , <i>Caryopteris grata</i> y <i>Mimosa rubicaulis</i>	Diferentes partes	Metanol	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>Enterobacter coccus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus fumigates</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Khan, <i>et al.</i> , 2011
<i>Parthenium hysterophorus</i> , <i>Stevia rebaudiana</i> and <i>Ginkgo biloba</i>	Hojas	Metanol, etanol y diclorometano	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , y <i>Staphylococcus aureus</i>	Fazal <i>et al.</i> , 2012
<i>Adansonia digitata</i> , <i>Aframomum albulaceum</i> , <i>Hibiscus sabdarifa</i> , <i>Ocimum gratissimum</i> y <i>Tamarindus indica</i>	Hojas	Metanol	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Djeussi, <i>et al.</i> , 2013
<i>Withania somnifera</i>	Raíces	Acuoso	<i>Staphylococcus aureus</i>	Mehrotra <i>et al.</i> , 2016

Modificado de: Mahmood Ahmad y Mohammad Wajid (2013)

El proceso de introducción de nuevos principios activos farmacológicos se inicia en con la identificación química para la evaluación de la actividad farmacológica, luego su desarrollo de forma farmacéutica y finalmente su farmacocinética, lo mismo ocurre en el caso de los ingredientes terapéuticos de origen vegetal (Ncube *et al.*, 2008). Los productos naturales han visto un uso creciente debido a la aparición de resistencia microbiana a los antimicrobianos y los efectos secundarios debido a los agentes antimicrobianos de origen sintético. Ahora la investigación está enfocada en los derivados vegetales o productos vegetales crudos (Parekh *et al.*, 2005, Khan *et al.*, 2009). En el cuadro 2 se muestran cuáles son los principales metabolitos o compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

**Cuadro 2.** Principales clases de compuestos antimicrobianos de plantas

Tipo de compuesto	Subclase	Ejemplo	Mecanismo	Referencia
Fenoles	Fenoles simples	Catecol, Epicatequina	Privación de sustrato, daño de membrana	Pérez <i>et al.</i> , 1997; Toda <i>et al.</i> , 1992
	Acido fenólico Quinonas	Acido cinámico Hipericina	Vincular a adhesinas inactivar las enzimas	Fernández, <i>et al.</i> , 1996; Duke <i>et al.</i> , 1985; King <i>et al.</i> , 1994
	Flavonoides Flavonas	Crisina Abisinona	Complejo con células, inactivación de enzimas	Perret <i>et al.</i> , 1995; Rojas <i>et al.</i> , 1992; Brinkworth <i>et al.</i> , 1992; Ono <i>et al.</i> , 1989
Capsaicinoides		Capsaisina	Ruptura de membrana	Cichewiks <i>et al.</i> , 1996
Alcaloides	Isoquinolinas Piperidínicos	Berberina, piperina	Intercala en la pared celular y/o ADN	Atta-ur-Rahman <i>et al.</i> , 1995; Burdick, 1971; Freiburghaus <i>et al.</i> , 1996; Houghton <i>et al.</i> , 1994

Modificado de: Cowan (1999)

## 2.5. *Rhoeo discolor*

*Rhoeo discolor* es conocida como *Maguey morado* cuya sinonimia es *Tradescantia spathodea*, *Rhoeo spathacea*. En realidad no se trata de un Maguey, pero es de apariencia similar. También se le conoce bajo los nombres de Zopilotea, Cordobán, Rheo, Reo, Rhea, Roeo, Amor de hombre, Moisés en la cuna (del inglés Moses in the cradle). Pertenece a la familia de las *Commelinaceae* (Pérez, 1996).

*Rhoeo discolor* es una planta originaria del Caribe y Centroamérica, principalmente de México. Se encuentra en los estados de Chiapas, Puebla, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, y Yucatán (Figura 2). Habita en climas cálido y semi-cálido desde el nivel del mar hasta los 1200 m. Es una planta cultivada en huertos familiares, asociada a bosques tropicales sub-perennifolio y perennifolio (Pérez, 1996). Su calificación taxonómica es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Fanerógamas*

División: *Tracheophyla*

Clase: *Angiospermae*

Clase: *Monocotyledoneae*

Subclase: *Commelinidae*

Orden: *Commelinaceae*

Género: *Rhoeo*

Especie: *discolor*

Sinónimo: *Tradescantia spathacea*



**Figura 2.** Distribución de *R. discolor* en la República Mexicana. Modificado de Dominguez-Ortiz (2003)

### 2.5.1 Botánica

*R. discolor* es un pequeño arbusto, perennifolio con tallo corto del que salen numerosas hojas empalmadas, arrosetadas, alargadas, lanceoladas de 30 o más cm de largo con haz de color verde y el envés de color púrpura. Las flores son pequeñas, blancas, nacen de las axilas de las hojas y están protegidas por brácteas moradas (Domínguez Ortiz, 2003) (Figura 3). El tallo de las flores es pequeño y grueso. Las flores le añaden valor estético a la planta.



**Figura 3.** Planta de *Rhoeo discolor*. A. Planta B. Flores. Fotografía tomada por Abril C. Díaz Toral

### **2.5.2 Usos medicinales y actividad biológica**

Son diversas las aplicaciones medicinales que esta planta tiene en diferentes estados de la República Mexicana. En Chiapas se usa para curar llagas y heridas, lavándolas con la cocción de las hojas tres veces al día o hasta que sane la zona afectada. En Puebla se utiliza para tratar el cáncer, con este fin se machaca un puño de hojas secas y se espolvorean en el área dañada, además se hace un té con las hojas y se toma diariamente en ayunas una taza.

En Tabasco se emplea como desinfectante, desinflamatorio y contra el tétano, para lograr tales efectos las hojas se hierven y con esta agua se lavan las partes afectadas, al igual que las heridas. Es utilizada para la cefalea se aplican en la cabeza las hojas soasadas, untadas con vaporub, y se amarran con un trapo. Para tratar la tos y el asma, se bebe el jugo de las hojas con miel y limón. Este preparado también se usa cuando hay infecciones y dolores intestinales, también se puede ocupar el té preparado con las hojas, de igual manera es usado para el dolor de riñón. En Veracruz se le ocupa como antiinflamatorio, para tratar el cáncer, la gangrena y para lavar heridas. Y en Yucatán como antiséptico (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2015)

Alguno de los beneficios que se le atribuye en la medicina tradicional son como potente desinflamatorio, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, cicatrización de heridas y como antigripal. Estudios realizados en investigaciones de laboratorio le han atribuido a la planta como potencial de actividad antiparasitaria, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, antigenotóxica, antioxidante (Ramírez-González *et al.* 2011, Díaz *et al.* 2008, González-Avila *et al.* 2003, Reyes *et al.* 2015)

**Cuadro 3.** Actividad antimicrobiana de diferentes extractos de la planta *Rhoeo discolor*.

Tipo de extracto	Parte de la planta	Microorganismo	Referencias
Etanolico	Hojas	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Balatero <i>et al.</i> , 2017
Hexánico cloroformo, éter de petróleo, acetona etil acetato, metanol, acuoso	Hojas	<i>Listeria innocua</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> .	García-Varela <i>et al.</i> , 2015
Hidrolato (EtOH + Agua)	Hojas	<i>Moniliophthora roreri</i>  <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i>	Nikam, 2013
Hexánico Metanólico	Hojas	<i>frexneri</i> <i>Staphilococcus aureus</i> <i>Salmonella tiphy</i>	Reyes <i>et al.</i> , 2010
Metanólico	Hojas	<i>Staphyococcus epidermidis</i>	Díaz <i>et al.</i> , 2008
Benceno, cloroformo, metanol, éter petróleo, acuso	Hojas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus citrus</i> , <i>Serratia sp.</i> <i>Salmonella typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> <i>pneumonia</i> , <i>Proteus vulgaris</i> .	Parivuguna <i>et</i> <i>al.</i> ,2008
Etanólico	Hojas	<i>Salmonella tiphy</i>	González-Avila <i>et al.</i> , 2003

## **2.6 Métodos de detección de Actividad antimicrobiana**

### **2.6.1 Método de difusión en agar (Kirby Bauer)**

Método cualitativo, el principio de este método se realiza con un antibiograma, fundamentado en el método de difusión que consiste en depositar en la superficie de una placa con agar previamente inoculada con el microorganismo y en ellos se impregnan discos de papel filtro con los diferentes antibióticos, transcurridos cierto tiempo de incubación, los discos pueden aparecer o no rodeados por una zona de inhibición de crecimiento del microorganismo. Entre las ventajas de este método es de fácil control y estandarización además de ser sencillo y barato (Taroco *et al.*, 2008).

### **2.6.2 Método de dilución en agar**

Utilizado generalmente determinar si un compuesto a probar es letal contra un microorganismo, para esto se preparan diferentes diluciones de los antimicrobianos y estas se añaden al agar para posteriormente ponerlos en cajas Petri para su solidificación. Una vez solidificado los microorganismo de prueba son inoculados en el agar e incubados a temperatura y tiempo óptimo para cada microorganismo, generalmente de 16-24 h (Reyes-Jurado *et al.*, 2014).

### **2.6.3 Método de dilución y microdilución en caldo**

Cuando se desea realizar pruebas para sensibilidad con antimicrobianos es necesario realizar técnicas que detecten cuantitativamente el efecto de inhibición de los antimicrobianos a evaluar, esto se hace con el fin de ahorrar tiempo, reactivos y por ende dinero destinados al desarrollo de la investigación. En microbiología es muy utilizada la técnica de microdilución para el análisis de distintos tipos de antimicrobianos (Taroco *et al.*, 2008)

El método de microdilución en caldo es una adaptación del método de dilución. Esta técnica involucra pequeños volúmenes del caldo de cultivo, se realizan las pruebas en microplacas de 96 pozos, cómo máximo cada pocillo debe contener 1 ml de caldo. Entre las ventajas de este método se encuentran; manejo de varias cepas al mismo tiempo y expuestas a varios antimicrobianos, lectura automatizada, midiendo la densidad óptica en un lector de ELISA. (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2003).

Los métodos se clasifican en cualitativos y cuantitativos. Los métodos cuantitativos nos permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). En donde la CMI se le considera como la concentración mínima de un antibiótico que en un periodo de tiempo determinado tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del inóculo bacteriano a una concentración conocida, mientras que la CMB es la concentración mínima de un antibiótico que en un periodo de tiempo determinado, es capaz de inducir la muerte del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada (García-Sánchez *et al.*, 2013). Los métodos cualitativos por su parte son aquellos que permiten clasificar a los microorganismos como sensibles o resistentes.

#### **2.6.4 Concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida o fúngica**

Se refiere a la concentración mínima de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad, ya sea por el método de dilución en agar o en caldo. Las técnicas de sensibilidad se utilizan para realizar una medición cuantitativa de la actividad “*in vitro*” de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano de interés. Los criterios para la interpretación de esta técnica se basan en un punto de corte para poder indicar si el microorganismo a estudiar es sensible, intermedio o resistente (*MIC Testing*, 2006).

- Sensible, si existe una probabilidad buena de éxito terapéutico en caso de un tratamiento con un dosis específica.

- Intermedio, si el éxito terapéutico es el esperado se puede conseguir un efecto a ciertas concentraciones.
- Resistente, la probabilidad de éxito es reducida o nula en algunos casos, no se espera ningún efecto cual fuerte sea del tratamiento.

Este método es muy utilizado en laboratorios de microbiología clínica. Entre sus ventajas se encuentran, ser muy eficaz, técnica muy sensible, resultados reproducibles y comparables.

Para este método se utilizan sistemas de microdilución en medio líquido en microplacas con pocillos y el crecimiento de los microorganismos en cada uno de los pocillos, las lecturas se hacen por medio de mediciones de turbidez o fluorescencia (Aquiahualt *et al.*, 2012)

## **2.7 Métodos de análisis fitoquímicos**

### **2.7.1 Fitoquímica cualitativa**

Esta técnica está basada en la utilización de una serie de reacciones colorimétricas para la detección de metabolitos secundarios. La reacción colorimétrica consiste en una solución acuosa en la que un sustrato reacciona con un reactivo para generar un cambio de color. Esta técnica es muy utilizada en fitoquímica para tener conocimiento si una planta o alguna de sus partes presentan o no algún tipo de metabolito secundario.

### **2.7.2 Cromatografía capa fina (CCF)**

Técnica basada en la preparación de una capa uniforme de un absorbente dentro de una placa de vidrio u algún otro soporte. Consta de una fase móvil líquida y una fase estacionaria en su mayoría sólida. La fase estacionaria es un componente de tipo polar y el eluyente será menos polar que la fase estacionaria, de tal modo que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los más polares en

afinidad con la fase estacionaria polar. Este tipo de técnica tiene muchas ventajas en comparación a otras técnicas de cromatografía ya que los instrumentos que ocupan son simples, el tiempo necesario para la separación es menor y generalmente mejor, los reveladores que se utilizan pueden ser de tipo corrosivos que en el caso de otras técnicas destruiría el material, en resumen es un método adecuado para fines analíticos por ser simple y los resultados son reproducibles y de fácil interpretación. Para seleccionar el tipo de absorbente a utilizar se debe tener en cuenta el tamaño de partículas del absorbente, para la elección del eluyente influyen varios factores como la pureza del mismo, precio, evitar utilizar compuestos muy volátiles, que no contengan trazas de metales, no utilizar mezclas de eluyentes, algunos de los más utilizados en cromatografía de capa fina son; acetato de etilo, hexano, acetona, isopropanol, cloroformo, entre otros. Entre los reveladores más utilizados está la luz UV, introducción de una placa a vapores de yodo, rocío con una solución de agua y ácido sulfúrico, etc. (Lorenzo, 2006)

## **2.8 Bioautografía**

Este método es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas, es colocado sobre una placa de cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de disolventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto (Ncube *et al.*, 2008). La CCF es un método ideal para la separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el disolvente, evitando así la posible actividad de el mismo (Cretu y Morlock, 2013; Jesionek, Choma, Majer-dziedzic, y Malinowska, 2014).

La bioautografía es empleada como una técnica preliminar de tamizaje fitoquímico, para la detección de compuestos involucrados en la inhibición del crecimiento de microorganismos en mezclas complejas, como son los extractos de plantas (Choma y Jesionek, 2015). Dentro de las ventajas que tiene esta técnica es que simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos a partir

de extractos crudos de plantas , utilizando relativamente una poca cantidad de muestra, lo cual, es muy importante cuando se trabaja con extractos de plantas, además de dar conocimiento preciso de la polaridad de los compuestos activos (Runyoro, *et al.*, 2006); una vez que se ha estandarizado la técnica, resulta fácil su reproducibilidad (Silva *et al.*, 2005).

La técnica consiste en inocular e incubar la cepa de interés sobre el cromatograma a partir de un extracto obtenido, con el fin de poder observar el efecto de inhibición que tiene, indicando así la presencia de sustancias antimicrobianas en la muestra. Esta técnica es muy útil con el interés de separar sustancias con antecedente antimicrobianos, entre las ventajas de este método se encuentra que es altamente sensible y los resultados son muy visibles (Colorado *et al.*, 2007).

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas se han utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades desde tiempos antiguos y siguen siendo utilizadas en diferentes culturas, a pesar del gran avance observado en la medicina moderna en las últimas décadas.

Las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte en el estado de Oaxaca con 2,583 defunciones esto según la perspectiva estadista del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2016). Para tratar este padecimiento en los últimos años se han desarrollado diversos fármacos sintéticos, sin embargo, estos causan efectos secundarios a la salud de los pacientes y resistencia de los antibióticos. En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos accesibles a toda la población, se han desarrollado tratamientos a base de plantas medicinales. Entre las plantas más importantes con alto contenido de principios activos que se emplea como agentes terapéuticos se encuentra *R. discolor*, utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos entre los que destacan por su actividad antimicrobiana, antiinflamatorio y antioxidante. Estudios previos han demostrado que extractos de hojas de *R. discolor* tienen un potencial efecto como antimicrobiano.

## 4 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se ha venido presentando una tendencia creciente en la utilización de productos naturales para el tratamiento de enfermedades de importancia pública. Esta preferencia según (Hamburger y Hostettmann, 1991), proviene de básicamente tres razones fundamentales: la exploración y conocimiento de la naturaleza como fuente de una amplia variedad de moléculas bioactivas, el interés en terapias no convencionales que dejen a un lado los productos sintéticos, y la eficacia demostrada de un gran número de preparaciones fitofarmacéuticas.

*Rhoeo discolor* es una planta que se usa tradicionalmente para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, tos y para sanar heridas (inflamación, como agente cicatrizante, lavado de heridas), entre otras. Por lo que es interesante efectuar un estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de frente polaridad de *R. discolor* mediante la técnica de microdilución y CFF-bioautografía para conocer las concentraciones mínimas inhibitorias y los principales grupos de metabolitos secundarios que sean los responsables de la actividad antimicrobiana para contribuir en el descubrimiento de compuestos bioactivos, que puedan constituir una alternativa en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos antimicrobianos de origen natural.

## 5 HIPOTESIS

Los extractos de mayor polaridad de *Rhoeo discolor* presentaran mayor actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras de importancia clínica por el método de microdilución y la técnica de CCF-Bioautografía.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de diferente polaridad de *Rhoeo discolor* mediante la técnica de microdilución y CCF-Bioautografía sobre bacterias y levaduras de importancia clínica.

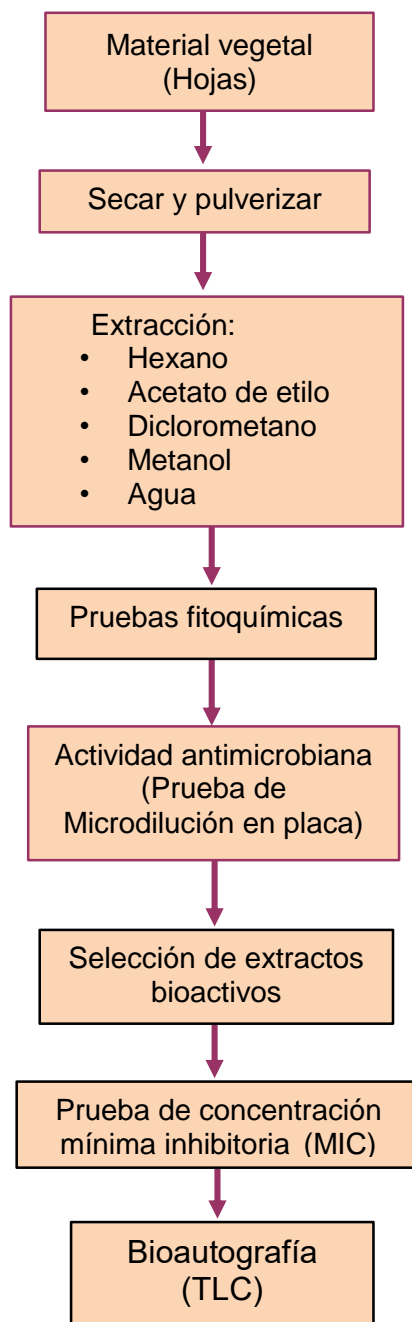
### 6.2 Objetivos particulares

1. Realizar un análisis fitoquímico preliminar de los extractos de *R. discolor*.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *R. discolor* utilizando la técnica de microdilución en placas.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) de *R. discolor* de los extractos bioactivos.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos bioactivos mediante la técnica de CCF-bioautografía.

## 7 METODOLOGÍA

### 7.1 Diagrama Experimental

El diseño experimental que se utilizará será por bloques en donde las variables son los tipos de extractos y los microorganismos, para el experimento se realizarán por bloques en base al tipo de microorganismo, bacterias y levaduras. El diseño se propone de la siguiente forma:



## 7.2 Material biológico

### 7.2.1 Bacterias y levaduras de origen clínico y de referencia

Las cepas de bacterias y levaduras de interés médico que se utilizaron en las pruebas fueron donadas por el Laboratorio de Bacteriología Medica del Departamento de Microbiología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB, IPN). Las cepas clínicas y de referencia, para bacterias y levaduras se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Microorganismos de prueba

BACTERIAS	LEVADURAS
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida glabrata</i> AC
<i>Escherichia coli</i> AC	<i>Candida glabrata</i> CBS 138
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida krusei</i> AC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
<i>Salmonella tiphi</i> ATCC 6539	
<i>Salmonella tiphi</i> AC	
<i>Shigella frexneri</i> ATCC 8224	
<i>Shigella frexneri</i> AC	

Nota: AC= Aislado clínico, ATCC= American Type Culture Collection (Cepas de referencia)

Las cepas fueron mantenidas en refrigeración y posteriormente se resembraron para utilizarse antes de cada prueba. Se activaron las cepas bacterianas y de levaduras para confirmar la viabilidad de las mismas en medio agar Mueller-Hinton (MH) y en medio Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), respectivamente. Para la obtención de los inóculos, se tomaron con el asa de cultivo 5 colonias  $\geq 1$  mm y de 24 h de crecimiento en placa de MH o SDA para bacterias o levaduras, respectivamente y se re-suspendieron en medio RPMI. Luego, se re-suspendieron de 3 a 5 colonias aisladas de cada microorganismo en 5 mL de caldo MH y medio

RPMI-1640 para bacterias y levaduras, respectivamente. La suspensión se incubó durante 2-6 h hasta lograr una turbidez comparable al estándar, 0.5 unidades de la escala de McFarland equivalentes a  $1 \times 10^8$  UFC/mL para bacterias y de  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  UFC/mL para levaduras (García-Rodríguez *et al.*, 2008).

### 7.2.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado fueron hojas de *Rhoeo discolor* colectado durante la temporada primavera-verano, en los meses de Abril y Mayo del 2016 en la comunidad de San Felipe de la Peña, Tuxtepec Oaxaca, municipio de San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca (Figura 4) localizada sobre la carretera Tuxtepec-Palomares, Km 147, ubicada en las coordenadas geográficas, latitud Norte 17.8361, longitud Oeste -95.9344 y una altura de 140 msnm. Los criterios que se tomaron para la recolección fueron los siguientes: plantas de un tamaño uniforme, observándose que no presentaran daño en las hojas o contaminación por plaga. Se recolectó un peso total aproximado de 10 Kg de material vegetal, equivalentes a 20 plantas aproximadamente.



**Figura 4 .** Ubicación geográfica de la recolección

El punto en rojo muestra la ubicación de la zona donde se llevó acabo la recolección de las muestras de *R. discolor*. (Fuente: GoogleMaps)

### **7.3 Preparación de los extractos**

Las hojas de *R. discolor*, se cortaron en trozos pequeños, posteriormente se secaron a 60°C hasta eliminar totalmente el agua de los tejidos. Una vez secadas, las hojas se trituraron hasta obtener un polvo fino.

La obtención de los extractos fue realizada en un baño de ultrasonido digital de 6 L (Digital Ultrasonic Cleaner, Scientz, China) operando a 40 KHz y a una potencia de 180 W con termostato para regular temperatura. La temperatura de extracción fue de  $25 \pm 2$  °C y la relación sólida líquida (g/mL) se fijó en 1/100 durante 2 h. Para ello, se colocaron 20 g de material vegetal seco y pulverizado en 200 ml de disolventes con diferente polaridad: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua, obteniendo 5 fracciones en gradiente de polaridad. En todos los casos, los extractos obtenidos fueron filtrados al vacío utilizando un papel Whatman N° 1 y concentrados bajo presión reducida en un evaporador rotatorio a 45 °C y 80 rpm. Los extractos obtenidos se llevaron a peso constante mediante liofilización y finalmente se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso (Capataz *et al.*, 2007).

### **7.4 Análisis fitoquímico preliminar**

Se realizaron diferentes ensayos con reacciones químicas para la identificación, mediante cambios de color o formación de precipitados la presencia de grupos de metabolitos secundarios en los extractos que se describen en la Cuadro 5 (Patil y Deshmukh, 2016). Para ello, se pesaron 3 a 5 mg de cada uno de los extractos extracto y posteriormente se disolvieron en 1 mL de agua y 1 mL de etanol.

**Cuadro 5.** Pruebas fitoquímicas preliminares. Modificado de Patil y Deshmukh, (2016)

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Ensayo cualitativo</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Terpenos</b>	2mL de extracto + 2mL Anhídrido acético + 3 gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	Coloración rojo oscuro
<b>Glucósidos</b>	2 mL de extracto + 2 mL CHCl <sub>3</sub> + 2mL CH <sub>3</sub> COOH	coloración violeta a azul
<b>Proteínas</b>	2 mL de extracto + 2 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Concentrado)	Precipitado blanco
<b>Emodinas</b>	2 mL de extracto + 2 mL de NH <sub>4</sub> OH + 3 mL de benceno	Coloración roja
<b>Taninos</b>	2mL de extracto + 2 mL de agua + 3 gotas de FeCl <sub>3</sub>	Precipitado verde
<b>Cumarinas</b>	2 mL de extracto + 2 mL de NaOH (10%)	Coloración amarilla
<b>Flavonoides</b>	2 mL de extracto + Pb (OAc) <sub>4</sub> (10%)	Coloración amarilla
<b>Saponinas</b>	5 mL de extracto + 5 mL de agua , calentar	Aparición de espuma
<b>Alcaloides</b>	2 mL de extracto + 1 mL de agua + 1 mL de etanol + 1 mL de solución Dragendorff´s	Precipitado color naranja
<b>Carbohidratos</b>	2 mL de extracto + 10 mL de agua + 2 gotas de α-naftol etanólico (20%) + 2 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	Anillos color violeta a rojizo en la unión
<b>Fenoles</b>	2 mL de extracto + 1mL de agua + 1 mL de etanol + 3 gotas de FeCl <sub>3</sub>	Formación de anillo color azul a verde oscuro
<b>Antocianinas</b>	2mL de extracto + 2mL de HCl (2 N)	Coloración de rojiza a purpura
<b>Esteroides</b>	2 mL de extracto + 2 mL de CHCl <sub>3</sub> + 2 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	Anillo café a rojizo en la unión

#### 7.4 Actividad antimicrobiana de los extractos de *R. discolor*

Para poder evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos se realizó el método de microdilución en placas debido a que se obtiene una mayor sensibilidad para medir la inhibición de crecimiento, la técnica está basada en poner

en contacto directo al microorganismo con el antimicrobiano en este caso con cada tipo de extracto en el mismo medio de cultivo (Taroco *et al.*, 2008). El ensayo se realizó de acuerdo con los métodos de referencia CLSI M7-A7 para bacterias (Clinical Laboratory Standards Institute 2006) y M27-A3 para levaduras (Clinical Laboratory Standards Institute (NCCLS) 2002) para los extractos crudos de *R. discolor*.

Para ello, se pesaron 64 mg de cada extracto y se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego se diluyó en 5 mL de agua destilada estéril para obtener una concentración final de 12.8 mg/mL (esto también se realizó para eliminar la acción microbicida del DMSO 1%). Cada extracto fue almacenado en alícuotas de 0.5 mL en tubos Ependorff y se mantuvieron almacenados -20°C hasta su uso.

Los microorganismos de interés clínico (bacterias y levaduras), fueron preparados a partir de una suspensión proveniente de un cultivo de 24 h en medio de agar Mueller-Hinton (MH) y Agar Dextrosa Saboraud (SDA) para bacterias y levaduras, respectivamente. Luego, se re-suspendieron de 3 a 5 colonias aisladas de cada microorganismo en 5 mL de caldo MH y medio RPMI-1640 para bacterias y levaduras, respectivamente. La suspensión se incubó durante 2-6 h hasta lograr una turbidez comparable al estándar, 0.5 unidades de la escala de McFarland equivalentes a  $1 \times 10^8$  UFC/ml para bacterias y de  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  UFC/mL para levaduras.

Una vez obtenido los inóculos, se utilizó la metodología propuesta por Rodríguez-Hurtado (2015) para la evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de microdilución. De cada extracto a una concentración de 12.8 mg/mL se colocaron 150  $\mu$ L en los pocillos de la microplaca, más 150  $\mu$ L del inóculo de cada uno de los microorganismo. Después, las microplacas fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 24 horas pasado este tiempo se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a 490 nm (Bio-Rad,USA) (Cantón *et al.*, 2007) (Cercenado

Emilia, 2008). Las pruebas fueron realizadas por triplicado. El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la siguiente ecuación:

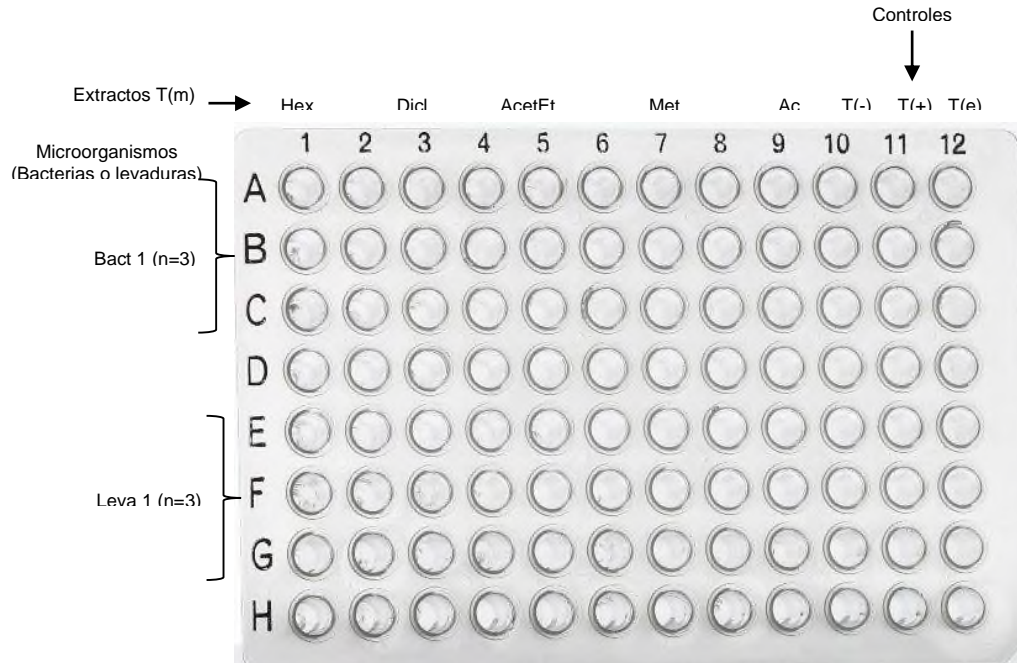
$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{\text{Absorbancia del tratamiento control} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del tratamiento control}} \right) \times 100$$

Donde:

Absorbancia del tratamiento control: corresponde tratamiento positivo de crecimiento (Medio de cultivo inoculado con el microorganismo, T(+))

Absorbancia de la muestra = corresponde a cada uno de los tratamientos con los extractos (Medio de cultivo inoculado con el microorganismo más el extracto a probar)

En la figura 5 se muestra el diseño de la placa para la técnica de microdilución, se T(+) corresponde al tratamiento positivo de crecimiento que contiene el medio RPMI inoculado con el microorganismo (Bacteria o levadura), el tratamiento de la muestra ( Tm) corresponde a cada uno de los pozos inoculados con medio de cultivo RPMI más microorganismo (Bacteria o levadura) y cada uno de los extractos (Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo, Metanol y Acuoso), el T(-) corresponde al tratamiento negativo de crecimiento (según antibiótico o antimicótico utilizado de referencia) y el T(e) corresponde al medio de cultivo con cada uno de los extractos., en cada uno de los tratamientos se realizaron por triplicado.



**Figura 5.** Diseño de la microplaca utilizado para el ensayo de microdilución.

### 7.5 Concentración mínima inhibitoria, Concentración mínima bactericida y fúngica.

El ensayo de microdilución en placas se realizó de acuerdo con los métodos de referencia CLSI M7-A7 para bacterias (Clinical Laboratory Standards Institute, 2006) y M27-A3 para levaduras (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002) para los extractos crudos de *R. discolor* que presentaron porcentajes de inhibición superiores al 50%, se determinó la susceptibilidad de los extractos sobre los microorganismos de estudios. Brevemente, se prepararon diluciones dobles seriadas de los extractos metanólicos y acuosos en microplacas de 96 pocillos en caldo Mueller-Hinton para bacterias o medio RPMI 1640 para levaduras. Para ello, se agregó a cada pocillo 150  $\mu$ L de cada uno de los inóculos de las cepas bacterianas y levaduras preparadas como se describieron anteriormente. Luego se adicionaron 150  $\mu$ L hasta concentraciones finales seriadas entre 12.8 a 0.02 mg/mL de los extractos. Las placas fueron selladas durante el período de incubación para reducir la evaporación, al finalizar este tiempo, se midió la densidad óptica 490 nm

en lector de microplacas. La CMI se calculó como la mínima concentración del extracto que inhibe completamente el crecimiento bacteriano y se expresó en mg/mL. Se siguió el mismo procedimiento para el control de esterilidad (280  $\mu$ L caldo + 20  $\mu$ L extracto), control negativo (280 $\mu$ L caldo + 20  $\mu$ L DMSO) y para el control positivo (280  $\mu$ L caldo + 20  $\mu$ L de los antibióticos Gentamicina® o Vancomicina® (12.8 mg/mL-0.02 mg/mL) o Fluconazol y anfotericina B como antimicóticos (12.8 mg/mL – 0.02 mg/mL). (MIC Testing, 2006), (Ruiz, 2013).

Las concentraciones bactericida mínima (CBM) y las concentraciones fungicidas mínimas (CFM) fueron determinada a partir de las concentraciones de los extractos que mostraron completa inhibición del crecimiento bacteriano, en el ensayo de determinación de la CMI, se tomó un inóculo con un asa estéril y se realizó un subcultivo en placas de Petri con agar MH y SDA. Las placas inoculadas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante el tiempo adecuado para cada bacteria y levadura, 24 h, luego del cual se evaluó la presencia o no de crecimiento de colonias bacterianas. La CBM y CFM se calculó como la mínima concentración del compuesto que no permite el crecimiento visible de colonias en la placa de Petri. En caso de observarse crecimiento, se concluyó que esa concentración del extracto produce un efecto bacteriostático (Russell, 1978; Hallet *et al.*, 1995).

## **7.6 TLC-Bioautografía**

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se emplearon placas semi-preparativas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck (20 x 20 cm, 2 mm de espesor, Merck). El seguimiento de la separación de los compuestos se llevó a cabo a través de la observación de los perfiles cromatográficos bajo la luz ultravioleta (longitud de onda corta ( $\lambda = 254$  nm y longitud de onda larga  $\lambda = 365$ ) con una lámpara (UVP J-124, USA). Se utilizó el sistema Diclorometano-Metanol (70:30) con el cual se logró previamente la mejor separación de los extractos bioactivos.

Para la visualización de los grupos de metabolitos en los extractos se utilizaron los siguientes reveladores:

- Solución 4-hidroxibenzaldehido: 0.5 mg de 4-hidroxibenzaldehido (Merck), 90 mL de etanol y 10 mL de ácido sulfúrico al 98% (Wagner et al., 1996)
- Solución Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0.5 mg de vainillina (Merck), 100 mL de etanol y 5 ml de Ácido sulfúrico (10%).
- Solución Lieberman: 5 mL de anhídrido acético, 5 ml de ácido sulfúrico, 50 ml de etanol.
- UV luz larga rosa (365 nm)

$R_f = L_1/L_2$ ; en donde L1 corresponde a la distancia recorrida por la muestra desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente y L2 es la distancia del frente del solvente (Lorenzo *et al.*, 2006), (Ramirez, 2009)

Se realizó la técnica de bioautografía directa con el fin de encontrar los grupos de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de los extractos activos (metanólico y acuosos) obtenidos anteriormente. Se inocularon las placas con 5  $\mu$ L extracto (12.8 mg/mL) y se eluyeron utilizando el sistema de (diclorometano-metanol: 70:30). Luego, las placas se secaron bajo una corriente de aire en movimiento rápido durante la noche, para eliminar las trazas de disolvente sobre las placas.

Los cromatogramas preparados se rociaron con la suspensión bacteriana o de levaduras ajustadas a una concentración 0.5 MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), este proceso se llevó a cabo en un Campana de flujo laminar (Marca VECO). A continuación, las placas se incubaron durante la noche a 35°C y 100% de humedad relativa y en oscuridad. Después, los cromatogramas fueron rociados una solución de 2 mg/mL de azul de tetrazolio (TNBT) Sigma® (Begue y Klein, 1972) y se incubaron durante 5 a 10 min a temperatura ambiente. Se determinó la actividad antimicrobiana en el cromatograma identificando así con las bandas blancas indicaron que no se produjo la reducción de TNBT al formazan coloreado debido a la presencia de compuestos que inhibían el crecimiento de los microorganismos ensayados. (Nostro *et al.*, 2000), (Nadinic *et al.*, 2002) .

## **7.6 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)**

Los análisis cromatográficos se realizaron de acuerdo con la metodología descrito por García-Varela *et al.* (2015) con diferentes modificaciones. La separación se llevó a cabo en una columna EVO C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex). La fase móvil consistió de dos solventes: ácido acético al 1% (A) y metanol (B), iniciando con 20 % B y usando un gradiente hasta obtener 50 % a los 18 min, 80 % a los 19 min y 20 % a los 20 min. Se utilizó un flujo de 0.21 mL/min con una temperatura de 40 °C y un volumen de inyección de 10 µL. La adquisición de datos espectrales se hizo en un rango de 200 a 600 nm y se capturaron los cromatogramas a 254 nm. Los análisis CLAR-DAD se llevaron a cabo en un equipo Acquity Arc (Waters) equipado con bomba cuaternaria, desgasificador, automuestreador, horno de columna y detector de arreglo de diodos. El sistema HPLC-DAD fue controlado por el programa Empower 3 (Waters). La cuantificación de compuestos fenólicos fue realizada utilizando estándares externos.

## **7.7 Análisis estadístico**

El análisis estadístico para la actividad antimicrobiana se desarrolló usando el programa estadístico SigmaStat V 4.0. Los datos obtenidos se analizaron como un diseño completamente al azar, seguido de una comparación de medias por el método de LSD de Fisher,  $p < 0.001$  fueron considerados como estadísticamente significativo.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSION

En este trabajo, obtuvieron 5 extractos crudos de distintas polaridades, a partir de hojas de *R. discolor*: Hexánico (H), Diclorometano (DM), acetato de etilo (AE), metanólico (M) y acuoso (Ac), cuyas características organolépticas se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Características organolépticas de los extractos crudos de *R. discolor*

Característica	H	DM	AE	M	Ac
<b>Color</b>	Verde	Verde oscuro	Verde	Café rojizo	Rojizo morado
<b>Olor</b>	Herbal	Olor especias	Olor aliáceo	Herbal	Dulce, herbal
<b>Sabor</b>	Herbal	Herbal	Astringente	Herbal	Dulce
<b>Consistencia</b>	Esposa y chiclosa	Arenosa	Oleaoginosa y viscosa	Arenosa	Terrosa y con cristales caramelizados

El porcentaje de rendimiento de cada uno de los extractos se calculó a partir del peso inicial de 20 g de material vegetal seco y pulverizado, como se muestra en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Porcentaje de rendimiento de los extractos

Extracto	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
<b>Hexano</b>	1.0110 ± 0.26	5.06 ± 0.20
<b>Diclorometano</b>	0.8861 ± 0.13	4.43 ± 0.01
<b>Ac. Etilo</b>	0.5739 ± 1.41	2.87 ± 0.18
<b>Metanol</b>	2.9401 ± 0.20	14.70 ± 0.21
<b>Agua</b>	5.8677 ± 0.46	29.34 ± 0.42

Los porcentajes de rendimientos más altos fueron alcanzados en los extractos acuoso y metanólico (29.34 % y 14.70 %, respectivamente), de igual manera a lo reportado Domínguez-Ortiz (2003) quien obtuvo un mayor rendimiento en el extracto acuoso, utilizando una cantidad inicial de material vegetal obtenido de hojas de 2200 g.

## 8.2 Análisis fitoquímico preliminar de los extractos

Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos se realizó un tamizaje fitoquímico preliminar por colorimetría. El análisis fitoquímico preliminar de los extractos crudos obtenidos de las hojas de *Rhoeo discolor* nos muestra la presencia de una gran cantidad de metabolitos secundarios tales como terpenos, taninos, cumarinas, flavonoides, saponinas, fenoles, alcaloides, antocianinas principalmente en los extracto metanólico y acuoso (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Rhoeo discolor*

Metabolitos secundarios	Extractos				
	Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Metanol	Acuoso
Terpenos	-	+	-	+	++
Glucósidos	-	-	-	-	-
Proteínas	-	-	-	-	++
Emodinas	-	-	-	-	-
Taninos	+	++		++	++
Cumarinas	-	-	+	+++	++
Flavonoides	-	-	++	+++	-
Saponinas	+	+	+	+++	++
Alcaloides	-	-	-	++	++
Carbohidratos	-	-	+	-	-
Fenoles	+	-	++	+++	+++
Antocianinas	-	-	-	-	+++
Esteroides	-	+	-	+	+

+++= Fuerte, ++= Medio, += Poca presencia, - = Ausencia. La clasificación se basó en la observación de la intensidad del color y cantidad del precipitado.

Las observaciones a cada grupo de metabolitos secundarios en los extractos crudos de *R. discolor* se describe a continuación:

**Terpenos:** Los extractos de diclorometano y agua, presentaron coloración rojo oscuro, para el caso del diclorometano la presencia de taninos fue poca y en el extracto acuoso tuvo presencia media.

**Glucósidos:** No se observó ninguna coloración en tono violeta o azul, en los cinco extractos.

**Proteínas:** El extracto que mostró presencia media fue el acuoso, visualizándose un precipitado de color blanco.

**Emodinas:** No hubo presencia de coloración roja en cualquiera de los cinco extractos utilizados.

**Taninos:** De los cinco extractos utilizados solo en cuatro se visualizó un precipitado verde que indica la presencia este grupo de compuestos, sin embargo la ausencia de estos se observó en el extracto de acetato de etilo.

**Cumarinas:** El extracto metanólico mostró una presencia fuerte de coloración amarilla característica de la presencia de estos compuestos, los extractos acetato de etilo y acuoso mostraron presencia poca y media, respectivamente, sin embargo los extractos que no mostraron ese color fueron el hexánico y diclorometano.

**Flavonoides:** La coloración amarilla indicada en la prueba para estos compuestos se visualizó en los extractos acetato de etilo y metanol, en presencia media y fuerte, respectivamente.

**Saponinas:** La persistencia de la espuma se consiguió en el extracto metanólico de manera constante, en el caso de los extractos hexánico, acetato de etilo, diclorometano y acuoso la persistencia de espuma fue poca para los primeros tres y en el caso del acuoso la persistencia fue media.

**Alcaloides:** Los extractos del tipo metanólico y acuoso mostraron presencia media del precipitado naranja característica de este grupo de compuesto, los extractos restantes mostraron ausencia de precipitado naranja.

**Carbohidratos:** Para esta prueba los extractos mostraron ausencia de anillos color violeta a rojizo, que indicaban la presencia de estos compuestos, sin embargo hubo una excepción en el extracto acetato de etilo que mostró poca presencia de esta característica.

**Fenoles:** El anillo color azul a verde oscuro tuvo alta presencia en los extractos metanólico y acuoso, presencia media acetato de etilo, poca presencia en el extracto hexánico y sin presencia en el extracto diclorometano.

**Antocianinas:** Las antocianinas se hicieron presentes mostrando una coloración purpura únicamente en el extracto acuoso.

**Esteroides:** El anillo de color café característico en la prueba positiva para detección de este grupo de compuestos, se mostró con poca presencia en los extractos diclorometano, metanólico y acuoso.

Estos resultados son similares a lo reportado por Domínguez-Ortíz, (2003), y Parivuguna *et al.* (2008) donde observaron la presencia de esteroides, saponinas, terpenoides, flavonoides y fenoles.

### **8.3 Actividad antimicrobiana de los extractos de *R. discolor***

En el cuadro 9, se muestran los porcentajes de inhibición de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de hojas de *R. discolor* a una concentración de 12.8 mg/mL en bacterias y levaduras. Los ensayos de microdilución en placa mostraron que los extractos metanólicos y acuosos en la mayoría de las cepas de bacterias y de levaduras probadas mostraron porcentaje de inhibición > 50% de la actividad microbiana. Siendo los valores más altos para la bacteria *S. tipheri* ATCC 6539 con valores del 58% y 54% para los extractos

metanólico y acuoso, respectivamente. Para las levaduras *C. krusei* ATCC 6258 el extracto metanólico mostro un 60% mientras que el extracto acuoso inhibió en un 57%

**Cuadro 9.** Porcentajes de inhibición de la actividad antimicrobiana de bacterias y levaduras

Microorganismos	Porcentaje de inhibición en los extractos (%)				
	Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Metanol	Agua
<b>Bacterias</b>					
<i>Escherichia coli</i> AC	24±0.03 <sup>a</sup>	21±0.04 <sup>c</sup>	36±0.01 <sup>b</sup>	51±0.02 <sup>d</sup>	54±0.01 <sup>e</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28±0.01 <sup>a</sup>	25±0.01 <sup>c</sup>	11±0.01 <sup>b</sup>	50±0.02 <sup>d</sup>	53±0.01 <sup>e</sup>
<i>Salmonella tphi</i> AC	27±0.02 <sup>a</sup>	23±0.01 <sup>c</sup>	44±0.02 <sup>b</sup>	51±0.02 <sup>d</sup>	54±0.02 <sup>e</sup>
<i>Salmonella tphi</i> ATCC 6539	21±0.03 <sup>a</sup>	14±0.02 <sup>c</sup>	38±0.01 <sup>b</sup>	54±0.03 <sup>d</sup>	58±0.02 <sup>e</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> AC	31±0.04 <sup>a</sup>	2±0.01 <sup>c</sup>	40±0.03 <sup>b</sup>	52±0.01 <sup>d</sup>	50±0.02 <sup>e</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	31±0.03 <sup>a</sup>	2±0.01 <sup>c</sup>	42±0.02 <sup>b</sup>	50±0.01 <sup>d</sup>	52±0.01 <sup>e</sup>
<i>Shigella frexneri</i> AC	21±0.01 <sup>a</sup>	10±0.01 <sup>c</sup>	27±0.01 <sup>b</sup>	41±0.02 <sup>d</sup>	41±0.01 <sup>d</sup>
<i>Shigella frexneri</i> ATCC 8224	24±0.01 <sup>a</sup>	10±0.01 <sup>c</sup>	30±0.02 <sup>b</sup>	42±0.02 <sup>d</sup>	41±0.02 <sup>d</sup>
<b>Levaduras</b>					
<i>Candida krusei</i> AC	5±0.01 <sup>a</sup>	14±0.02 <sup>c</sup>	8±0.02 <sup>b</sup>	52±0.03 <sup>d</sup>	51±0.01 <sup>d</sup>
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	26±0.02 <sup>a</sup>	17±0.02 <sup>c</sup>	29±0.01 <sup>b</sup>	60±0.02 <sup>d</sup>	57±0.01 <sup>e</sup>
<i>Candida glabrata</i> AC	11±0.02 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	2±0.02 <sup>b</sup>	51±0.02 <sup>d</sup>	50±0.01 <sup>d</sup>
<i>Candida glabrata</i> ATCC 138	34±0.03 <sup>a</sup>	21±0.01 <sup>c</sup>	16±0.01 <sup>b</sup>	50±0.01 <sup>d</sup>	51±0.01 <sup>d</sup>

Nota: AC: Aislado clínico. ATCC: American Type Culture Collection (cepas de referencia). El análisis LSD-Fisher con un valor de P = <0.001. Las letras iguales representan la diferencia significativa entre los tratamientos en cada microorganismo de prueba.

El interés en el estudio de *R. discolor* como fuente de sustancias antimicrobianas surge a partir del conocimiento de sus actividades biológicas previamente reportadas y de algunos antecedentes existentes acerca de sus estudios químicos.

En el presente trabajo se encontró que los extractos más polares (metanólico y acuoso) poseen la mayor actividad antimicrobiana. La mayoría de los estudios han señalado que los extractos de tipo alcohólico y acuosos a partir de hojas de *R. discolor* muestran actividad biológica contra diferentes bacterias. Al respecto, se ha reportado que el extracto acuoso de *R. discolor* mostró un porcentaje de inhibición

contra la bacteria *Shigella flexneri* del 50% a concentraciones de los extractos de 32 mg/mL, 16 mg/mL y 8 mg/mL mediante ensayo de difusión en gar (Domínguez-Ortiz, 2003) mientras que en este estudio con una concentración de los extractos de 12.8 mg/mL se encontró que los extractos de alta polaridad (metanólico y acuoso) presentaron 41-42% contra *Shigella flexneri* ATCC 6538 y AC.

Por otro lado, Santiago-Pérez (1996) reportó que los extractos acuoso de hojas de *R. discolor* presenta inhibición significativa de crecimiento bacteriano de *S.aureus* similares a lo reportado en este estudio.

Parivuguna *et al.*, (2008) reportaron actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de diferente polaridad (éter de petróleo, benceno, cloroformo, metanol y agua) de *R. discolor* contra ocho cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus citreus*, *Serratia sp.*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris* encontrado un efecto dosis dependiente de la actividad antibacteriana. En este estudio los extractos de baja y mediana polaridad (hexano, acetato de etilo y diclorometano) no presentaron actividad antimicrobiana, esto probablemente a la baja presencia de metabolitos encontrados por el tamizaje fitoquímico (Cuadro 8).

Balatero y Matuod (2016) demostraron que *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* son resistentes al extracto etanólico de *R. discolor* a concentraciones de 0.01-0.03 mg/mL quedando con estos resultados demostrado que a bajas concentraciones de los extractos, esto debido a la concentración baja de compuestos antimicrobianos que pueden encontrarse en el extracto etanólico, no reportan si existe un porcentaje de inhibición significativa de crecimiento microbiano en las diversas bacterias.

En el estudio de Ganub *et al.*, (2017) se ha sugerido que la etapa de crecimiento de la planta, así como el lugar de recolección influye en la obtención de extractos bioactivos. En su caso, no encontraron actividad antibacteriana para los

microorganismo que ellos probaron, sin embargo consideran que se deben realizar la evaluación en otras cepas de microorganismo. En este estudio se tomó en cuenta la utilización de una amplia variedad de bacterias y levaduras.

A partir de estos resultados, se seleccionaron los extractos metanólico y acuoso para estimar las concentraciones mínimas o concentraciones críticas en todos aquellos microorganismos que presentaron porcentaje de inhibición  $\geq 50\%$ . Las concentraciones para los tipos de bacterias y levaduras variaron en cada especie de las mismas y también dependiendo el tipo de extracto.

En el cuadro 10, se muestran los resultados del ensayo de sensibilidad bacteriana y fungicida para el extracto metanólico y acuoso, presentaron valores en las concentraciones inhibitorias, bactericidas y fúngicas similares para las bacterias *E. coli* AC, *E. coli* ATCC 10836 y *S. aureus* AC con una CMI de 3.2 mg/mL y CMB 6.4 mg/mL, mientras que para *S. tipheri* AC, *S. tipheri* ATCC 6539, *S. frexneri* AC y ATCC una CMI de 1.6 mg/mL y CMB 3.2 mg/mL y en las levaduras: *C. krusei* AC y *C. glabrata* CBS 138, con una CMI de 1.6 mg/mL y CMB de 3.2 mg/mL, para *C. krusei* AC y *C. krusei* ATCC 6258 fueron diferentes, con una CMI de 1.6 mg/mL y CMB 3.2mg/mL, CMI de 0.8 mg/mL y CMB 3.2 mg/mL, respectivamente.

Por otro lado, se observaron valores especialmente bajos de concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas para *S. tipheri* AC y *S. tipheri* ATCC 6539, con el extracto acuoso. No se encontró efecto del disolvente sobre las células microbianas, por lo tanto la presencia de principios activos en los extractos le confieren la actividad bacteriostática o bactericida.

**Cuadro 10.** Concentraciones mínimas inhibitorias, bactericidas o fúngicas, del extracto metanólico y acuoso.

Microorganismos	Extracto Metanólico			Extracto Acuoso		
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMF (mg/mL)
<i>E. coli</i> AC	3.2	6.4		3.2	6.4	
<i>E. coli</i> ATCC 10836	3.2	6.4		3.2	6.4	
<i>S. tphi</i> AC	1.6	3.2		0.8	1.6	
<i>S. tphi</i> ATCC 6539	1.6	3.2		0.8	0.8	
<i>S. aureus</i> AC	3.2	6.4		3.2	6.4	
<i>S. frexneri</i> AC	1.6	3.2		0.8	1.6	
<i>S. frexneri</i> ATCC 8224	1.6	3.2		0.8	1.6	
<i>C. krusei</i> AC	1.6		3.2	1.6		3.2
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0.8		3.2	1.6		6.4
<i>C. glabrata</i> AC	6.4		1.6	1.6		3.2
<i>C. glabrata</i> CBS 138	1.6		3.2	0.8		3.2

Nota: CMI: concentración mínima inhibitoria, CMB: Concentración mínima bactericida, CMF: concentración fungicida mínima.

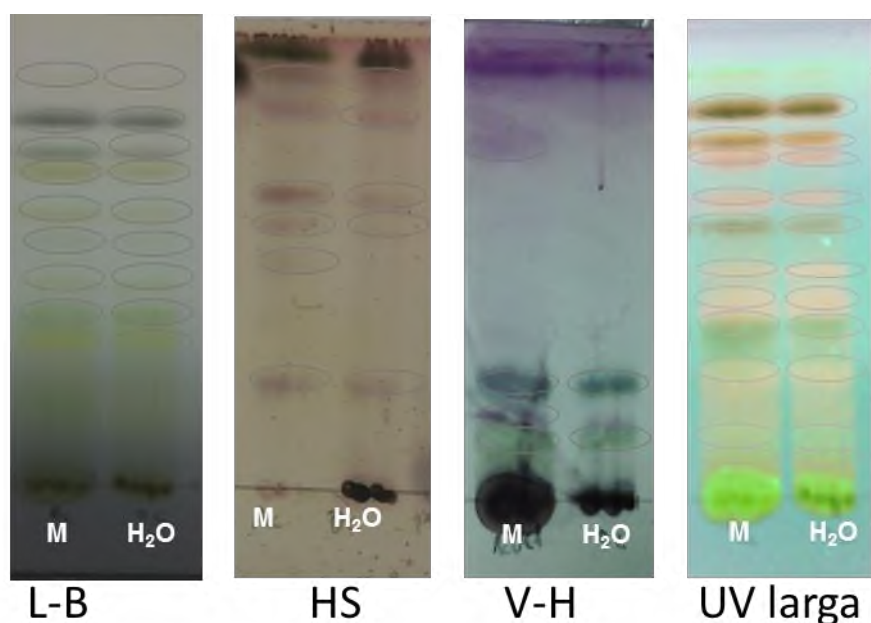
No hay reportes que sugieran la Concentración mínima inhibitoria de extractos de *R. discolor*, sin embargo se han realizados múltiples estudios en extractos vegetales provenientes de otras plantas. Las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas reportadas en plantas como *Cassia alata*, *Shinus terebintifolius* y *Eucalyptus* sp, oscilan en un rango de 2.58-0.32 mg/mL, en bacterias de *Aeromonas salmocida* (Núñez *et al.*, 2002).

En todos los estudios de búsqueda de CMI y CMB de extractos vegetales se demuestra que los extractos de naturaleza polar son los más activos para la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos, a concentraciones dentro de un rango de 32 mg/mL a 8 mg/mL. Sin embargo en este trabajo se encontraron valores

pequeños de CMI y CMB encontrados para extractos metanólico y acuoso de *R. discolor*.

#### 8.4 Cromatografía en capa fina y CCF-Bioautografía

Los cromatogramas en placa fina de los extractos de *R. discolor* eluidos con el sistema diclorometano: metanol (70:30) nos permitió distinguir una amplia cantidad de bandas en cada uno de los reveladores utilizados (Figura 7). Con el revelador L-B se detectaron 9 bandas para los dos tipos de extractos, el cual es específico para la detección de colesterol, esteroides, esteroides y triterpenos. Se detectaron 6 bandas para el extracto metanólico y 5 bandas para el acuoso con el revelador HS mostrando coloraciones de azul para fenoles, rojo para terpenos, gris para azúcares y verde para esteroides.



**Figura 6.** Cromatografía en capa fina de los extractos de *R. discolor* eluidos con el sistema: diclorometano: metanol de etilo 70:30. L-B: Liebermann Buchard, HS: 4-Hidroxibenzaldehído, V-H: vainillina-ácido sulfúrico y UV Larga: luz UV larga

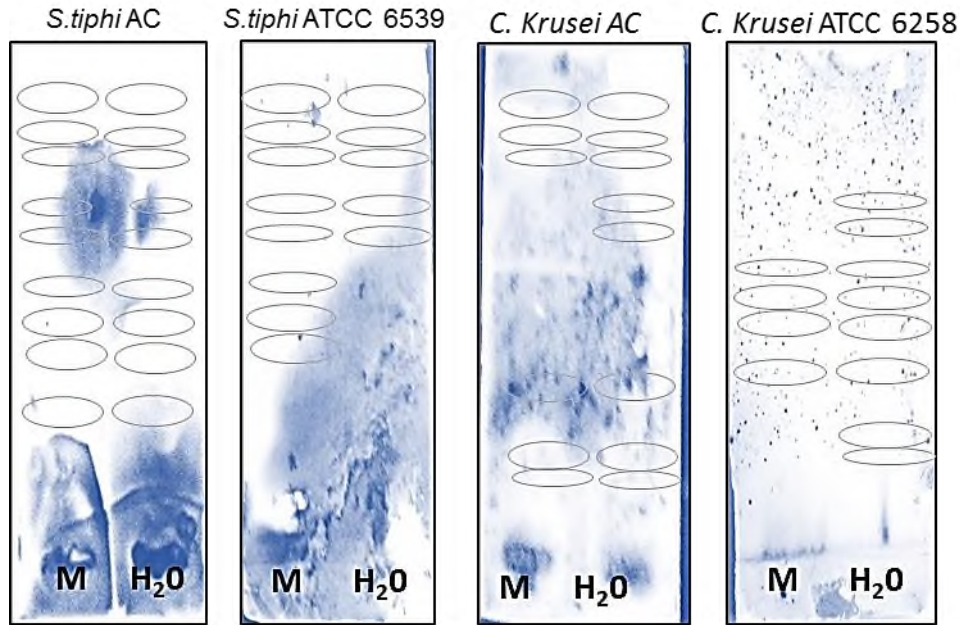
Con el revelador V-H se detentaron 4 bandas para el extracto metanólico y 2 bandas para el acuoso el cual sirve para detectar la presencia de alcoholes superiores, fenoles, esteroides y aceites esenciales, dando bandas de color rojo, azul-verdoso y violeta. En luz UV de onda larga se detectaron 11 bandas en los dos extractos metanólico y acuoso.

A cada una de esas bandas enumeradas de arriba hacia abajo, se les calculó su factor de retención ( $R_f$ ), los cuales son mostrados en el cuadro 11.

**Cuadro 11.**  $R_f$  de las bandas encontradas mediante cromatografía en Capa Fina de los extractos de *R. discolor* utilizando a fase móvil Diclorometano: metanol 70:30

Banda	Metanol				Acuoso			
	UV-L	L-B	V-H	HS	UV-L	L-B	V-H	HS
	Rf (cm)				Rf (cm)			
1	0.86	0.96		0.96	0.86	0.96		0.96
2	0.77	0.86		0.86	0.77	0.86		0.86
3	0.68	0.68	0.68		0.68	0.68	0.68	
4	0.57	0.57		0.57	0.57	0.57		0.57
5	0.51	0.51		0.51	0.51	0.51		0.51
6	0.4	0.4		0.4	0.4	0.4		
7	0.31	0.31			0.31	0.31		
8	0.26	0.26			0.26	0.26		
9	0.19		0.19	0.19	0.19		0.19	0.19
10	0.14		0.14		0.14		0.14	
11	0.1				0.1			

En la figura 8 se muestran las imágenes de CCF-bioautografía de los microorganismos bacteria y levadura respectivamente, *S. tipheri* y *C. krusei* quienes fueron los que mostraron mayor facilidad para revelar la inhibición del crecimiento por la ausencia de color del reactivo TNBT, y así poder detectar los grupos de metabolitos y/o compuestos activos para la inhibición antimicrobiana, sin embargo aunque se realizó la técnica CCF-bioautografía para todos los microorganismos algunos no se visualizó bien la coloración azul del TNBT, esto debido al metabolismo de cada microorganismo ya que existen otros que difícilmente lo hagan.



**Figura 7.** CCF-Bioautografía de los extractos metanólico y acuoso de *R. discolor*.

En el cuadro 11 se muestran los valores de Rf de los compuestos antimicrobianos presentes en diferentes extractos se eluyeron con diclorometano: metanol (70:30) contra las bacterias *S. thipi* AC y ATCC 6539 y las levaduras *C. krusei* AC y *C.krusei* ATCC 6258 evidenciado con la ausencia de coloración del azul del reactivo utilizado (Azul de Tetrazolium). En algunos casos, no se observó inhibición del crecimiento microbiano basado en la reacción de coloración del TNBT o debido al tipo de método utilizado de bioautografía ya que puede variar el resultado al hacerlo por bioatografía directa o por contacto. La ausencia de actividad puede deberse a la evaporación de los compuestos activos, a la fotooxidación disminuyendo la cantidad del compuesto activo. También es posible que el sinergismo desempeñe un papel importante en los extractos que estaban activos cuando se determinó la concentración mínima inhibitoria de la mezcla, pero los compuestos separados no presentan actividad antimicrobiana basada en la bioautografía.

**Cuadro 12.** Inhibición de crecimiento en TLC-Bioautografía de los extractos metanólico y acuoso

Microrganismos	Extractos	R <sub>f</sub>	Bandas activas	Total de bandas	% de inhibición relativa
<i>Salmonella tify</i> AC	Metanólico	0.86, 0.77, 0.68, 0.57, 0.51, 0.4, 0.31, 0.19, 0.14	9	11	81
	Acuoso	0.86, 0.77, 0.68, 0.57, 0.51, 0.4, 0.31, 0.19, 0.14	9	11	81
<i>Salmonella tify</i> ATCC 6539	Metanólico	0.86, 0.77, 0.68, 0.57, 0.51, 0.4, 0.31, 0.26	8	11	72
	Acuoso	0.86, 0.77, 0.68, 0.57, 0.51	5	11	45
<i>Candida krusei</i> AC	Metanólico	0.86, 0.77, 0.68, 0.19, 0.14	5	11	45
	Acuoso	0.86, 0.77, 0.68, 0.57, 0.51, 0.19, 0.14, 0.1	8	11	72
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Metanólico	0.4, 0.36, 0.31, 0.19	4	11	36
	Acuoso	0.57, 0.51, 0.4, 0.31, 0.26, 0.19, 0.14, 0.1	8	11	72

Las zonas de inhibición nos indica la presencia de los metabolitos secundarios, como se encontró de acuerdo al análisis de fitoquímica preliminar los cuales en los extractos de naturaleza polar se encontraron compuestos como Terpenos, Taninos, Cumarinas, Saponinas, Alcaloides y Antocianinas y principalmente Fenoles. Estos coinciden con lo encontrado por Nikam *et al.*, (2003) en donde los resultados de fitoquímica revelaron la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos y fenoles.

La actividad antibacteriana de *R. discolor* no depende de un solo compuesto, ya que en la bioautografía de cada uno de los microrganismos evaluados se observaron halos de inhibición correspondientes a compuestos con diferente R<sub>f</sub>. Se ha reportado que los extractos acuosos ricos en fenoles de *R. discolor* mostraron actividad antimicrobiana frente a Gram positivas: *Listeria innocua* y *Streptococcus mutans*, Gram negativas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como al hongo patógeno *Candida albicans* (García-Varela *et al.*, 2015).

## 8.5 Análisis químico del extracto con mayor actividad biológica

La evaluación de la actividad biológica de los extractos de *R. discolor* condujo al análisis químico de los extractos metanólicos y acuosos, debido a que fueron los que presentaron la mayor actividad antimicrobiana.

### 8.5.1 Determinación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales en los extractos de diferente polaridad de *R. discolor*, se cuantificó por el método de Folin-Ciocalteu. La cantidad de fenoles se reporta en base a equivalentes de ácido gálico a partir de una solución stock de 1000 ppm, de la cual se obtuvo una curva estándar (Anexo I). Las concentraciones de fenoles totales obtenidas se muestra en el cuadro 13.

**Cuadro 13.** Concentración de fenoles totales en los extractos bioactivos de *R. discolor*.

Extracto	Concentración (ug EAG /mg de Extracto seco)
Metanol	43.27±0.59 <sup>a</sup>
Acuoso	51.65 ±0.24 <sup>b</sup>

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Tukey  $p < 0.05$ . (n=3)

El extracto con mayor concentración de fenoles fue el extracto acuoso, en comparación al extracto metanólico, esto probablemente se deba a la naturaleza polar de la mayoría de los compuestos fenólicos.

La cantidad de polifenoles del extracto acuoso de la hojas de *R. discolor* de este trabajo fueron 3.06 y 6.08 veces mayor que las reportadas por García-Varela *et al.* (2015) en el extracto acuoso de hojas secas hervidas y no hervidas (16.9 y 8.5 ug EAG/mg de extracto seco, respectivamente), evidenciando que la extracción acuosa asistida por ultrasonido utilizada en este estudio, incrementó la eficiencia de la misma (Proestos y Komaitis, 2006), al reducir el riesgo de la degradación térmica de al utilizar temperaturas de 25°C (Kimbaris *et al.*, 2006)

### 8.5.2 Determinación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales se empleó el método de  $\text{NaNO}_2 - \text{AlCl}_3$  (Dewanto *et al.*, 2002). El contenido de flavonoides se determinó mediante la curva de calibración (Anexo II), teniendo como estándar la quercetina a una concentración de 1.5 mg/mL. La mayor concentración de flavonoides se encontró de igual forma en el extracto del tipo acuoso, seguido por el metanólico por una diferencia mínima, pero estadísticamente diferentes. (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Concentración de flavonoides totales en extractos bioactivos de *R. discolor*

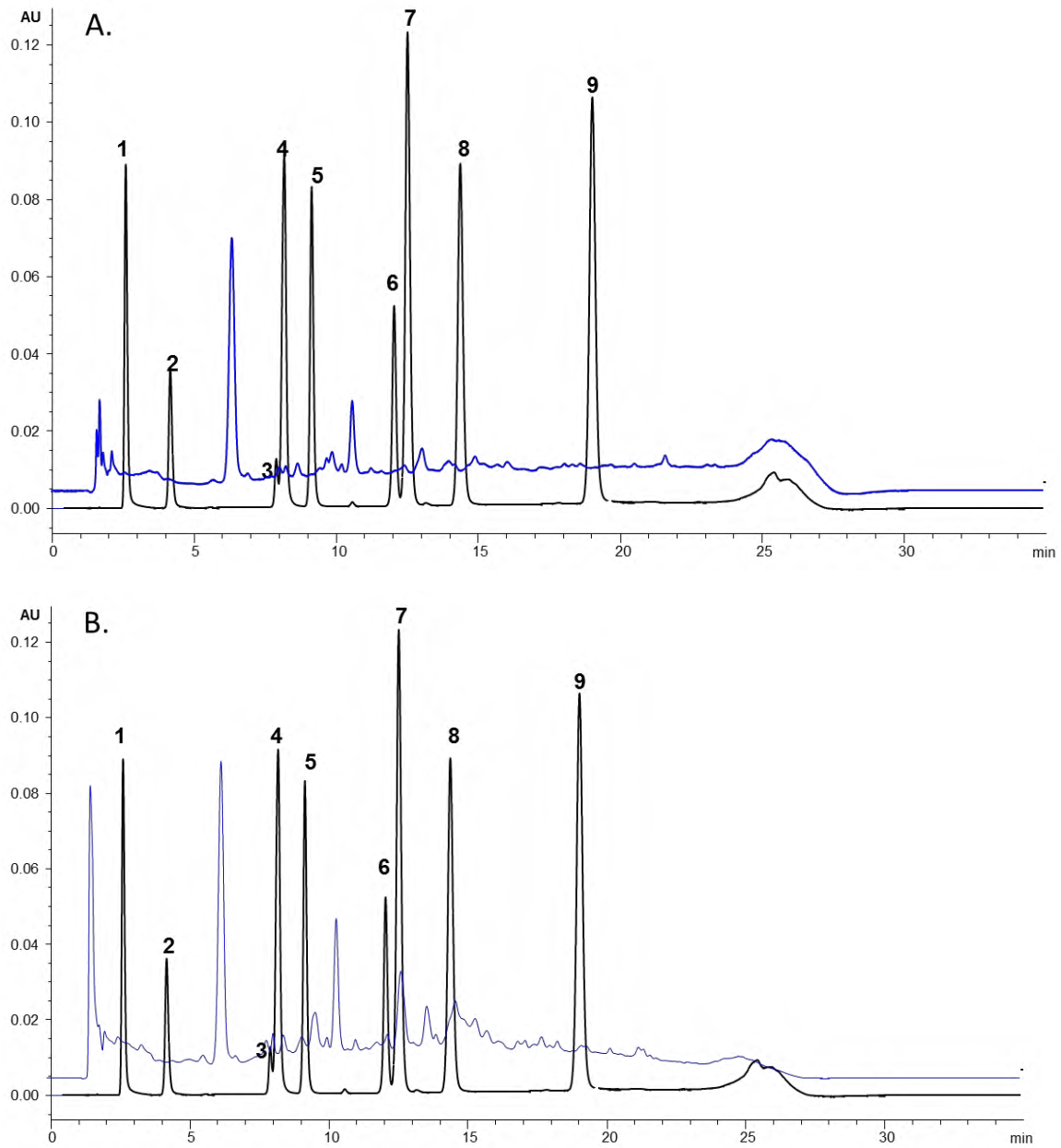
Extracto	Concentración (mg EQ /g de Extracto seco)
Metanol	0.53±0.008 <sup>a</sup>
Acuoso	0.56±0.006 <sup>b</sup>

Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Tukey  $p < 0.05$ . (n=3)

El contenido de flavonoides fueron 1.32 y 1.25 veces menores a lo reportado por Sánchez-Roque *et al.*, (2017) quienes encontraron que extracto metanólico de *R. discolor* contenía 0.7 mg EQ/g de extracto seco, cuya fracción rica en flavonoides mostró actividad contra el Virus de la Influenza A (H1N1).

### 8.6 Detección de compuestos fenólicos por CLAR

Mediante CLAR se analizaron los extractos metanólico y acuoso de *R. discolor* encontrando la presencia de varios compuestos fenólicos. El extracto acuoso que fue el más bioactivo se detectaron la presencia del ácido cafeico, ácido valínico, ácido ferúlico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido 2- hidroxicinámico y ácido cinámico. Así mismo, se observa la presencia de otros picos mayoritarios no identificados. De forma similar, García-Valera *et al.*, (2005), mediante el análisis por HPLC reportaron que los extractos acuosos activos de *R. discolor* contra varios microorganismos revelaron un contenido diverso de compuestos fenólicos como, ácido cumárico, ácido ferúlico.



**Figura 8. Cromatograma CLAR de los extractos bioactivos de *R. discolor* a 254 nm. A.** Extracto metanólico. **B.** Extracto acuoso. 1. Ácido gálico, 2. Ácido protocatecuico, 3. Ácido cafeico, 4.Ácido vanílico, 5. Ácido siríngico, 6.Ácido ferúlico, 7. 3-Hidroxicinámico, 8. 2-Hidroxicinámico, 9. Ácido cinámico. Los cromatogramas en color azul corresponden a los extractos metanólico y acuoso.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, forman parte de un avance en el estudio de *Rhoeo discolor*, esto debido a que es una planta muy utilizada en la medicina tradicional en diversas partes del país, principalmente en los estados del sur, por lo que resulta ser una fuente potencial de estudios y aplicaciones. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los extractos de *R. discolor*, podrían aplicarse a agentes antisépticos con fines alimentarios y médicos además de que se reportó las concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas y fungicidas las cuales son indispensables para el seguimiento de las dosis aproximadas de consumo de compuestos obtenidos a base de plantas. Es importante señalar que los que los extractos más activos fueron los más polares, en especial el extracto acuoso. Esto representa una gran ventaja ya que las compañías farmacéuticas favorecen estos procedimientos en la formulación y aplicación de nuevos productos, debido a su bajo riesgo para la salud.

## 9 . CONCLUSIONES

*Rhoeo discolor* posee varios compuestos con actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras, de interés clínico.

Los extractos de alta polaridad (metanólico y acuoso) mostraron actividad antibacteriana y antifúngica mayor al 50% contra 6 bacterias y 4 levaduras a concentraciones de 12.8 mg/mL.

Los extractos metanólico y acuoso presentaron efectos bacteriostático y bactericida con concentraciones mínima inhibitoria superiores a 0.8 mg/mL contra *S. tphi* y de 3.2 mg/mL contra *C. glabrata*.

El análisis de bioautografía de los extractos metanólico y acuoso revelaron al menos 9 componentes antibacterianos mientras que se encontraron 5 componentes antifúngicos con diferentes zonas de inhibición.

Es posible que los compuestos fenólicos sean los responsables de la actividad antimicrobiana de *Rhoeo discolor* sobre bacterias y levaduras.

## 10. REFERENCIAS

- Abu-shanab B, Adwan G, Abu-safiya D, Jarrar N and Adwan K. (2004). Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turkish Journal of Biology*, 28(1): 99-102
- Ahmad M., and Wajid M. (2013). Plants as potential source of antimicrobial agents. *Journal of Phaymacy and Alternative Medicine*, 2(3), 18–25.
- Aguilar A., Camacho R., y Chino, S. (1994). Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. (IMSS), México. 35.
- Atta-ur-Rahman M. I., Choudhary L. (1995) Diterpenoid and steroidal alkaloids. *Natural Products Reports*, 12:361–379
- Aquiahuatl M.A., Volke T., Prado L.A., Shirai K., Ramírez F. y Salazar M. (2012). Manual de Microbiología General, 1. Ed. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa pp. 61-66.
- Biblioteca Digital De La Medicina Tradicional Mexicana. Obtenido de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7820>. Fecha de consulta: 28/Septiembre/2016.
- Brinkworth R. I., Stoermer M. J. and Fairlie D. P. (1992) Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188:631–637.
- Burdick E. M. (1971) Carpaine, an alkaloid of *Carica papaya*. *Its chemistry and pharmacology Economic Botany*. 25:363–365
- Camacho Assef V. (2010). Los antimicrobianos en la práctica médica. *Medicina Intensiva*.16-21.
- Cantón E., Martin E. y Espinel A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología Clínica*, 15,1.
- Capataz T. J., Orozco S. F., Vergara R. and Hoyos S. (2007). Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio. *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 60(1): 3703-3715.

Cercenado, Emilia (2008). Procedimientos en Microbiología clínica. Seimc.Org. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientosmicrobiologia30.pdf>

Cichewicz R. H. and Thorpe P. A. (1996). The antimicrobial properties of *chile peppers* (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal Ethnopharmacology*. 52:61–70.

Colorado J., Galeano E., y Martínez A. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica* 14, 67-71.

Cosme Pérez I. (2008). El uso de las plantas medicinales, 23-26.

Cowan P. and Marjorie Murphy (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). M7-A7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). M100-S16, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

Cretu G. C. and Morlock G. E. (2013). Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 146. 104-112.

Díaz Oliva V., Ernesto C., García L., y Rivera, L. Q. (2008). Estudio químico y farmacológico del extracto hidroalcohólico de Maguey Morado (*Tradescantia spathacea* Swartz).

Dewanjee S., Gangopadhyay M. and Bhattacharya N. (2014) Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84.

Dewanto V., Xianzhong W. and Rui Hai L. (2002). Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4959–4964.

Djeussi D. E., Noumedem J. A., Seukep J. A., Fankam A. G., Voukeng I. K., Tankeo S. B. and Kuete, V. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:164.

Domínguez Ortiz Miguel A. (2003). Elucidación estructural y actividad antimicrobiana de metabolitos presentes en Maguey morado (*R. discolor*). (Tesis de Doctorado) Universidad de Colima. Colima, México.

Duke James A. (1985) Handbook of medicinal herbs. CRC Press, Second editions, Boca Raton, Florida. Pp 123-129.

Estrada García T., Cerna J.F., Pacheco Gil L., Velázquez R., Ochoa Torres J. and DuPont H. (2005). Drug resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, México. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1306-1308.

Fazal H., Ahmad N., Ikram Ullah, Inayat H., Khan L. and Abbasi B.H. (2011). Antibacterial potential in *Parthenium hysterophorus*, *Stevia rebaudiana* and *Ginkgo biloba*. *Pakistan Journal of Botany*, 43(2): 1307-1313

Fernández M. A., García M. D. and Sáenz M. T. (1996) Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal Ethnopharmacology*. 53:11–14

Figuroa Ochoa I. y Verdugo Rodríguez A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 25-42. <https://doi.org/10.1107/s1744309108039882>

Freiburghaus F., Kaminsky R., Nkunya M. H. and Brun R. (1996) Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *Journal Ethnopharmacology*. 55:1–11.

Ganub J. and Monsales, M. (2017). Antibacterial activity of *Rhoeo discolor* Hance. (Tesis de doctorado). University of San Carlos, Talamban, Cebu, Filipinas.

García Rodríguez J., Cantón R., y Picazo, J. (2008). Procedimientos en Microbiología Clínica. Seimc.Org. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>

García Sánchez J., García García M., García Garrote F. y Sánchez Romero I. (2013). Diagnostico microbiológico de las infecciones intra-abdominales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(4), 230-239. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.023>.

García Varela R., García García R. M., BarbaDávila B. A., Fajardo Ramírez O. R., Serna Saldívar S. O. and Cardineau G. A. (2015). Antimicrobial activity of *Rhoeo discolor* phenolic rich extracts determined by flow cytometry. *Molecules*, 20(10), 18685–18703.

González-Avila M., Arriaga-Alba M., de la Garza M., del Carmen HernándezPretelín M., Domínguez-Ortíz M.A., Fattel-Fazenda S., Villa-Treviño S.(2003). Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract. *Toxicol In Vitro*. 17(1):77-83.

Gutiérrez Cogco L., Montiel Velázquez E., Aguilera Pérez P., y Gonzales Andrade M. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. *Salud Pública de México*, 42(6), 490-495.

Gregorí B. (2005). Estructura y Actividad de los Antifúngicos *Revista Cubana de Farmacología* 39 (2): 30-45.

Houghton P. J., Woldemariam T. Z., Khan A. I., Burke A. and Mahmood N. (1994) Antiviral activity of natural and semi-synthetic chromosome alkaloids. *Antiviral Research*. 25:235–244.

Hamburguer M. and Hostettmann K. (1991). In plants: the link between and medicine. *Phytochemistry*, 30(12), 3864–3874.

Hernández Cortez C., Aguilera Arreola M. y Castro Escarpulli G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinal en México, Resumen. 31(4), 137-151.

Jesionek W., Choma I. M., Majer-dziedzic, B. and Malinowska, I. (2014). Screening bacterial and radical scavenging properties of chosen plant extracts using thin-layer chromatography-direct bioautography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37–41.

Khan A.M., Qureshi R.A. and Faizan Ullah (2011). Antimicrobial activity of selected medicinal plants of Margalla hills, Islamabad, Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18): 4665-467.

Khan R., Islam B., Akram M., Shakil S., Ahmad A., Ali S.M., Siddiqui M. and Khan A.U. (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multidrug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 14(3): 586-597.

Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daeferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S. and Polissiou M.G. (2006). Composition of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativus*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 13:54-60.

King S. R. and Tempesta M. S. (1994). From shaman to human clinical trials: the role of industry in ethnobotany, conservation and community reciprocity. *Ciba Foundation Symposium*. 185:197–206

Lorenzo M. (2006) Detección por cromatografía de capa fina (CCF) de metabolitos antifúngicos producidos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS. *ICIDCA*, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar 40(1), 27-30. Ciudad de La Habana, Cuba

Malbrán Carlos. (2012). Método de determinación de la sensibilidad antimicrobiana por dilucion. MIC testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32(2), 2–5.

Nadinic E., Penna C., Saavedra C., Coussio J., Gutkind G., y Debenedetti S. (2002). Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho y Liu (Gentianaceae). *Acta Farmacéutica Bonarense*, 21(2), 123-130.

Narayan G.R., Kartik V., Manoj P., Singh P.S. and Alka G. (2010). Antibacterial activities of ethanolic extracts of plants used in folk medicine. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 1(2): 529-535.

Ncube N. S., Afolayan A. J. and Okoh A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin : current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797–1806.

NCCLS. (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Nikam M. B., Mundada P. S., Kadam D. A., Jadhav S. N. and Aparadh V. T. (2013). Comparative screening of various solvent for phytochemical testing using some commelinaceae members. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS)* 3(2), 18–20.

Nostro A., Germanó M., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M., Germano M., and D'angelo V. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30(5), 379-384.

Onyeagba R.A., Ugbogu O.C., Okeke C.U. and Iroakasi O. (2004). Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn.), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn.). *African Journal of Biotechnology*, 3(10): 552-554.

Ono K., Nakane H., Fukishima M., Chermann J.-C., and Barre Sinoussi F. (1989) Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5, 6, 7-trihydroxyflavone. *Biochememical, Biophysical Research Communications*. 3:982–987

Paredes F., y Roca J. (2015). Infecciones gastrointestinales, tipos, diagnósticos y tratamientos, 23, 25-31.

Parekh J., Jadeja D. and Chanda S. (2005). Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turkish Journal of Biology*, 29(1): 203-210

Parivuguna V. and Gnanaprabhal R. (2008). Antimicrobial Properties and Phytochemical Constituents of *Rhoeo discolor* Hance. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 841–45.

Patil U. and Deshmukh O. (2016). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used as traditional medicine. *International Journal of Pharmaceutical, International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 7(1). 77-81.

Pérez L. (2006). Estudio Fitoquímico y Actividad Antimicrobiana de *Rhoeo spathacea* (Sw.) Stearn. (Tesis de maestría) Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México

Peres M., Monache F., Cruz A., Pizzolatti M. and Yunes R. (1997) Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal Ethnopharmacology*. 56:223–226

Perrett S., Whitfield P. J., Sanderson L. and Bartlett A. (1995). The plant molluscicide *Millettia thonningii* (Leguminosae) as a topical antischistosomal agent. *Journal Ethnopharmacology*. 47:49–54.

Ramírez L. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* (42), 263-268. Universidad Tecnológica de Pereira.

Ramírez González S., López Báez O., Guzmán Hernández T., Munguía Ulloa S. y Espinosa Zaragoza S. (2011). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri*. *Tecnología en marcha*, 24(2), 3-11.

Reyes Jurado F., Palou E. y López Malo A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8(1), 68–78.

Reyes Munguía, A. (2015). Propiedades antioxidantes del maguey morado (*Rhoeo discolor*). *CyTA, Journal of Food*, 37–41.

Rodríguez Hurtado A. I. (2015). Búsqueda de actividad antimicrobiana en N-acilaminoésteres, dipéptidos y derivados de ácido 3-feniláctico. (Tesis de Licenciatura). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

Rodríguez Tudela J., Barchiesi F., Bille J., Chryssanthou E., Cuenca Estrella M., Denning D. and Verweij, P. (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (8), i-viii.

Rojas A., Hernandez L., Pereda R. and Mata R. (1992) Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*. 35:275–283.

Roy S., Thanaserakan K., Dutta Roy A. and Sehgal S. (2006). Distribution of *Shigella* enterotoxin genes and secreted autotransported toxin gene among diverse species and serotypes of *shigella* isolated from Andaman Islands, India. *Tropical Medicine and International Health*, 11(11), 1694-1698.

Russell C. and Melville T. H. (1978), Bacteria in the Human Mouth. *Journal of Applied Bacteriology*, 44: 163–181.

Ruiz J. (2013). Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Runyoro D. K., Matee M. I., Ngassapa O. D., Joseph C. C. and Mbwambo Z. H. (2006). Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 1–10.

Salar R.K. and Dhall A. (2010). Antimicrobial and free radical scavenging activity of the extracts of some Indian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(22): 2313-2320.

Salud I., y Lii C. (2012). Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe Actual Año 2012.

Sánchez Roque Y., Ayora Talavera G., Rincón Rosales R., Gutiérrez Miceli F.A., Meza Gordillo R., Winkler R., Gamboa Becerra R., Ayora Talavera T.R. and Ruiz Valdiviezo V.M. (2017). The Flavonoid Fraction from *Rhoeo discolor* Leaves Acting as Antiviral against Influenza a Virus. *Records of Natural Products*. 11 (6): 532-546

Shoael A., Chakrabarty D., Ali M., Yu K., Hahn E., Lee H. and Paek K. (2006) Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochemistry*, 41(3), 512-518.

Silva M. T., Simas S. M., Batista T. G., Cardarelli, P. and Tomassini, T. C. (2005). Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and *physalin* B bringing out the importance of assay determination. *Memories Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 100 June, 779–782.

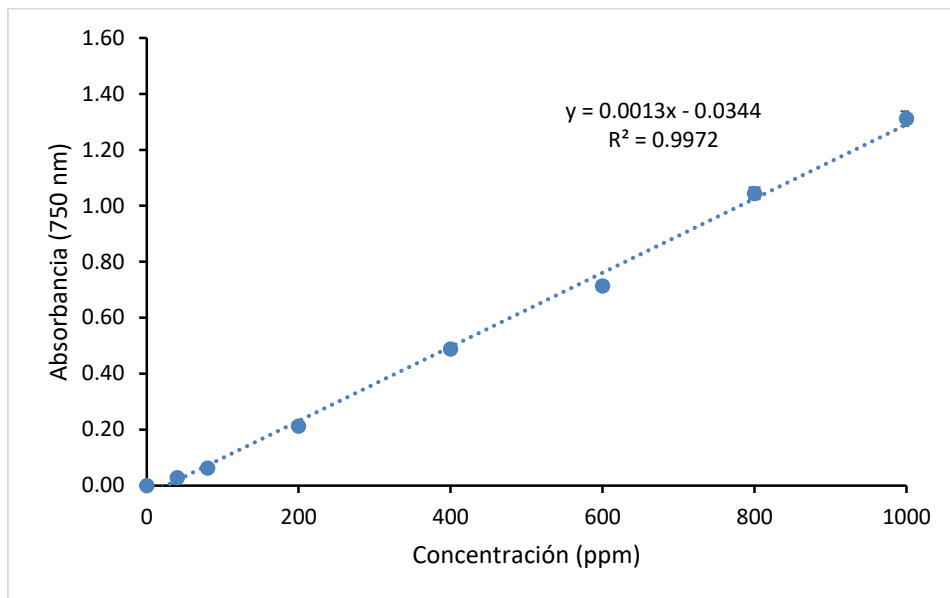
Taroco R., Seija V., y Vignoli R. (2008). Temas de Bacterología y Virología Médica. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica, 36, 663–672.

Toda M., Okubo S., Ikigai H., Suzuki T., Suzuki Y., Hara Y. and Shimamura T. (1992) The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiology and Immunology*. 36:999–1001.

Villar López M. (2001). Investigación en plantas medicinal. Manual de Fitoterapia. Programa Nacional de Medicina Complementaria- Essalud. 6, 75-90.

## 11 . ANEXOS

### Anexo I. Curva de calibración Polifenoles totales



### Anexo II. Curva de calibración Flavonoides totales

