



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Químicas

**Estudio fitoquímico de *Costus pulverulentus* (Costaceae) C. Presl
biodirigido hacia bacterias de importancia clínica y *Entamoeba histolytica***

HM1-IMSS

**Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas**

Presenta:

Bioq. Luis Rodrigo Ramiro Bautista

Director de tesis

Dr. Alejandro Hernández Morales

Co-director

Dra. Candy Carranza Álvarez



San Luis Potosí, S.L.P. México, Abril de 2020

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 00519, en el nivel Consolidado.

Número de registro de beca otorgada por CONACyT: 783136



Estudio fitoquímico de *Costus pulverulentus* (Costaceae) C. Presl biodirigido hacia bacterias de importancia clínica y *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS por Ramiro-Bautista, Luis Rodrigo se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Químicas



**Estudio fitoquímico de *Costus pulverulentus* (Costaceae) C. Presl
biodirigido hacia bacterias de importancia clínica y *Entamoeba histolytica*
HM1-IMSS**

**Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas**

Presenta:

BQ. Luis Rodrigo Ramiro Bautista

Integrantes del Jurado

Presidente: Dr. Alejandro Hernández Morales _____

Secretario: Dra. Candy Carranza Álvarez _____

Vocal: Dra. Denisse Atenea De Lorea Carrera _____

Agradecimientos

A la Dra. Liseth Rubi Aldaba Muruato y al Dr. José Roberto Macías Pérez por el invaluable apoyo técnico para el establecimiento del cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* IMSS y la estandarización de los ensayos antiamebianos.

Agradecimientos

A mi familia, amigos y todos los que me apoyaron en el transcurso de este proyecto y el tiempo que me dedicaron, especialmente mis padres y hermanos que siempre estuvieron para mí en las dificultades.

Al Dr. Alejandro Hernández mi director de tesis, por su paciencia y apoyo durante todo el transcurso de tiempo que estuve en el laboratorio, por sus consejos y comentarios.

A la Dra. Liseth Rubi Aldaba Muruato y al Dr. José Roberto Macías Pérez por el invaluable apoyo técnico para el establecimiento del cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* IMSS y la estandarización de los ensayos antiamebianos.

RESUMEN

Actualmente una de las mayores problemáticas en el área de la salud es la resistencia a los antimicrobianos, entre las alternativas edestaca el uso de plantas medicinales, sin embargo, es necesario realizar estudios científicos que validen sus propiedades y seguridad. Una planta con múltiples aplicaciones y que pudiera tener actividad antimicrobiana debido a los reportes previos es *C. pulverulentus*, para comprobarlo se realizó el Extracto Etanólico (E.E) del tallo de la planta, fraccionamiento del E.E con solventes y cromatografía en columna, pruebas antimicrobianas de difusión en disco, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), antiamebiana, caracterización química e identificación de toxicidad mediante pruebas con *Artemia salina*, lo resultados mostraron que el E.E tiene actividad contra *Cromobacterium violaceum* CV026 y *Bacillus* sp. a concentraciones de 10 y 30 µg/disco, la fracción metanólica muestra una actividad similar, mientras que la fracción 8 (F8) de 32 del fraccionamiento en columna conserva actividad únicamente contra *Bacillus* sp. y en pruebas contra bacterias de importancia clínica F8 inhibe el desarrollo de *S. aureus* y *S. aureus* Oxacilina resistente, la caracterización química de esta fracción reveló que los compuestos mayoritarios son ácido vanílico y cumárico para los cuales se derminó una CMI de 250 ppm sobre *S. aureus* del ácido cumárico y el ácido vanílico no mostró inhibición a las concentraciones usadas, adicionalmente el ácido cumárico mostró actividad amebostática contra *Entamoeba hisolytica* a concentraciones de 300 y 500 µM, ninguna de las mezclas evaluadas mostró efecto tóxico en la prueba de *A. salina*. Los resultados sugieren que *C. pulverulentus* puede ser usada como tratamiento complementario y emplearse para el control de crecimiento bacteriano y parasitario sin representar un riesgo de efectos secundarios.

PALABRAS CLAVE

Resistencia a antimicrobianos, *Costus pulverulentus*, efecto antimicrobiano, efecto amebostático, caracterización química.

ABSTRACT

Currently one of the biggest problems in the health area is antimicrobial resistance, among the alternatives the use of medicinal plants stands out, however, it is necessary to carry out scientific studies to validate their properties and safety. A plant with multiple applications and that could have antimicrobial activity due to previous reports is *C. pulverulentus*. To verify this, the Ethanolic Extract (EE) of the plant stem was carried out, fractionation of the EE with solvents and column chromatography, antimicrobial tests of disc diffusion, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), anti-amebic, chemical characterization and toxicity identification through tests with *Artemia salina*, the results showed that the EE has activity against *Cromobacterium violaceum* CV026 and *Bacillus* sp. At concentrations of 10 and 30 µg / disc, the methanolic fraction shows similar activity, while fraction 8 (F8) of 32 of the column fractionation retains activity only against *Bacillus* sp. and in tests against bacteria of clinical importance F8 inhibits the development of *S. aureus* and resistant *S. aureus* Oxacillin, the chemical characterization of this fraction revealed that the main compounds are vanillic and coumaric acid for which a MIC of 250 ppm was derived on *S. aureus* of coumaric acid and vanillic acid showed no inhibition at the concentrations used, additionally, coumaric acid showed amebostatic activity against *Entamoeba hisolytica* at concentrations of 300 and 500 µM, none of the evaluated mixtures showed a toxic effect in the *A. salina* test. The results suggest that *C. pulverulentus* can be used as a complementary treatment and used to control bacterial and parasitic growth without posing a risk of side effects.

KEY WORDS

Antimicrobial resistance, *Costus pulverulentus*, antimicrobial effect, amebostatic effect, chemical characterization.

ÍNDICE

CAPITULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES	2
1.3 JUSTIFICACIÓN	2
1.4 HIPÓTESIS	4
1.5 OBJETIVOS	4
1.5.1 Objetivo general.....	4
1.5.2 Objetivos específicos	4
CAPITULO II MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Resistencia a antimicrobianos.....	5
2.1.1 Consecuencias de la resistencia	5
2.1.2 Causas/factores de la resistencia.....	7
2.1.3 Tipos de resistencia.....	8
2.2 Investigaciones y tratamiento alternativos.....	12
2.3 Importancia del estudio de plantas medicinales.....	15
2.4 Actividad biológica de extractos vegetales.....	19
CAPITULO III METODOLOGÍA.....	23
3.1 Colecta de material vegetal.....	23
3.2 Procesamiento de material vegetal.....	24
3.4 Elaboración del extracto	24
3.5 Fraccionamiento del extracto.....	24
3.5 Cromatografía en columna para el fraccionamiento del extracto	25
3.6 Cromatografía en capa fina (TLC).....	26
3.7 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	26
3.8 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (bacterias)	27
3.9 Actividad antiparasitaria contra <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS	30
3.10 Determinación de la toxicidad con <i>Artemia salina</i>	31
3.11 Análisis estadístico	31
CAPITULO IV RESULTADOS	32
4.1 Elaboración del Extracto Etanólico de <i>C. pulverulentus</i>	32

4.2 Determinación de la actividad antimicrobiana del Extracto Etanólico (E.E.) de <i>Costus pulverulentus</i>	36
4.3 Determinación de la Actividad anti-Quorum Sensing del E.E. de <i>Costus pulverulentus</i>	38
4.4 Fraccionamiento del Extracto Etanólico de <i>C. pulverulentus</i>	39
4.5 Actividad antimicrobiana de las fracciones orgánicas obtenidas a partir del E.E.	40
4.6 Cromatografía en Columna abierta de la Fracción metanólica.....	42
4.7 Actividad antimicrobiana de las Fracciones (F1-F32).....	44
4.8 Actividad antimicrobiana contra microorganismos de importancia clínica	46
4.9 Análisis y caracterización de la F8	47
4.10 Efecto antibacteriano del ácido p-cumárico y ácido vanílico	48
4.11 Determinación de la actividad antiparasitaria contra trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS.....	50
4.12 Efecto del ácido p-cumárico en trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS	50
4.13 Estimación de la dosis del ácido p-cumárico que inhibe el 50 % de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	52
4.14 Efecto del ácido vanílico en trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS.....	53
4.15 Actividad tóxica contra <i>A. salina</i>	53
CAPITULO V DISCUSIÓN	55
CAPITULO VI CONCLUSIONES.....	61
CAPITULO VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias de importancia médica resistentes a antimicrobianos.....	10
Tabla 2. Sistema de solventes empleado en la Cromatografía en Columna.....	26
Tabla 3. Perfil cromatográfico del Extracto Etanólico de <i>Costus pulverulentus</i> . Donde T.R representa tiempo de retención y AR% = Área relativa.	32
Tabla 4. Resultados del efecto del E.E. contra las bacterias evaluadas.....	37
Tabla 5. Rendimiento de las fracciones orgánicas obtenidas a partir del E.E*.....	40
Tabla 6. Efecto antimicrobiano de las fracciones de <i>Costus pulverulentus</i> a 30µg/disco (Concentración establecida para discos de kanamicina, que es el antibiótico de referencia)	41
Tabla 7. Bacterias representativas por grupo de microorganismos evaluadas contra la fracción 8 (F8) de <i>C. pulverulentus</i>	47
Tabla 8. Perfil cromatográfico de la F8.....	48
Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria	50
Tabla 10. Prueba de toxicidad de E.E de <i>Costus pulverulentus</i> fracciones sobre <i>Artemia salina</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales vías para la biosíntesis de metabolitos secundarios y su relación con el metabolismo primario (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2006).	16
Figura 2. Estructuras químicas de ácidos fenólicos. Ácidos hidroxibenzoicos, A) ácido protocatecuico, B) ácido vanílico, c) ácido gálico. Ácidos hidroxicinámicos, D) ácido p-cumárico, E) ácido ferúlico, F) ácido clorogénico. (Tomado y modificado de Peñarrieta et al. 2014).	18
Figura 3. Morfología <i>Costus pulverulentus</i> A) Hojas B) Flor C) y D) Tallo.	20
Figura 4. Sitio de colecta de plantas de <i>C. pulverulentus</i>	23
Figura 5. Proceso de fraccionamiento primario del Extracto Etanólico (EE) de <i>Costus pulverulentus</i>	25
Figura 6. Diagrama de prueba de difusión en disco.	28
Figura 7. Diagrama de prueba de difusión en disco para medir el efecto contra Quorum Sensing de CV026	30
Figura 8. Efecto del E.E. de <i>C. pulverulentus</i> contra A) <i>Bacillus</i> sp., B) <i>E. faecalis</i> , C) <i>E. coli</i> , D) <i>K. pneumoniae</i>	38
Figura 9. Efecto del E.E. contra <i>C. violaceum</i> CV026. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.	39
Figura 11. Efecto de las fracciones 1-6 en el desarrollo de A) <i>Bacillus</i> sp. B) <i>Enterococcus faecalis</i> C) <i>C. violaceum</i> CV026 d) <i>C. violaceum</i> CV026. *Todas las pruebas se hicieron por triplicado.	42
Figura 12. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna abierta a partir de la fracción metanólica.	43
Figura 13. Efecto de las fracciones 1-12 en el desarrollo de A) <i>C. violaceum</i> CV026 fracción 1-6 (10 µg/disco), B) <i>C. violaceum</i> CV026 fracción 7-12 (10 µg/disco), C) <i>Bacillus</i> sp. fracción 1-6 (10 µg/disco) D) <i>Bacillus</i> sp. fracción 7-12 (10 µg/disco) inhibición 8 ± 0 mm.	44
Figura 14. Efecto de la F8 en el desarrollo de A) <i>Bacillus</i> sp. y B) <i>C. violaceum</i> CV026 inhibición 8 ± 0 mm.	45
Figura 15. Efecto inhibitorio de la fracción 8 contra: A) <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y B) <i>S. aureus</i> oxacilina resistente (susceptibilidad heterogénea).	46
Figura 16. Las filas con medio MH se inocularon con A) <i>P. aeruginosa</i> , B) <i>S. aureus</i> , C) <i>E. coli</i> , D) <i>P. mirabilis</i> , E) <i>S. epidermidis</i> , F) <i>C. freundii</i> , G) <i>K. pneumoniae</i> , H) Control negativo, medio MH. En cada columna la concentración de ácido p-cumárico 1) 1000 µg/mL, 2) 500 µg/mL, 3) 250 µg/mL, 4) 125 µg/mL, 5) 62.5 µg/mL, 6) 31.25 µg/mL, 7) 15.62 µg/mL, 8) 7.82 µg/mL, 9) 3.90 µg/mL, 10) 1.95 µg/mL, 11) 0.97 µg/mL, 12) 0 µg/mL. El pozo en color rojo indica actividad bacteriana mediante la reducción del cloruro de tetrazolio.	49

Figura 17. Efecto antiamebiano del ácido p-cumárico contra trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.	51
Figura 18. Efecto del ácido p-cumárico en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS a las 24 h. A) Blanco, B) Control, C) 500 μ M (82 μ g/mL), D) Metronidazol.	51
Figura 19. Curva de dosis-respuesta de ácido p-cumárico sobre trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	52
Figura 20. Efecto antiamebiano del ácido vanílico contra trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS. Literales iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al control.	53

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una enorme y grave problemática causada por el aumento de la resistencia de microorganismos a los tratamientos antimicrobianos, se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones dejen de ser eficaces, como resultado, las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas (OMS, 2017). Según la OMS la resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, y pone en peligro la capacidad médica para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de las estancias hospitalaria, las muertes, y la prolongación de la enfermedad y con ello los costos médicos (OMS, 2016).

En el término más amplio la resistencia de diferentes tipos de microorganismos abarca la ineficacia a los medicamentos antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y fungicidas (OMS, 2017). Entre los microorganismos resistentes con una distribución más amplia y que representan un serio problema de salud por ser importantes agentes etiológicos de infecciones del tracto urogenital y gastrointestinal se encuentran los siguientes: Enterobacterias no encapsulada, *E. coli*; Enterobacteria encapsulada, *K. pneumoniae*; Cocos grampositivos, *S. aureus*; No enterobacteria, *P. aeruginosa*; Parásitos- *Entamoeba histolytica*; Hongos y parásitos, *C. albicans* (Cohen y Tartasky, 1997; Bansal, Malla, y Mahajan, 2006; Calderon y Aguilar, 2016).

El problema se vuelve más grave cuando se considera que la mayoría de los países a nivel mundial no tienen acceso cien por ciento garantizado a servicios de salud básicos. Por lo anterior y apoyados por la OMS se buscan alternativas basadas en la medicina tradicional y complementaria (MTC) de tratamientos para distintas enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos, principalmente aquellos que muestran resistencia a los medicamentos de primera elección. Una opción es el uso de plantas medicinales con efecto antimicrobiano, con la finalidad de brindar una opción eficiente y de bajo costo para el tratamiento de infecciones resistentes (OMS, 2014).

En la Huasteca Potosina la enorme biodiversidad existente permite disponer de una gran variedad de recursos herbolarios, se han realizado investigaciones sobre algunas plantas, entre ellas destaca *C. pulverulentus* por las aplicaciones etnofarmacológicas que se le dan y los estudios previamente realizados.

1.2 ANTECEDENTES

El género *Costus* comprende un gran número de especies, de las cuales algunas han sido reportadas previamente como plantas usadas en la medicina tradicional entre ellas se puede mencionar *Costus igneus* usada para disminuir niveles de glucosa en sangre (Deogade, 2014), en publicaciones posteriores *C. pulverulentus* fue reportado como una planta de interés etnofarmacológico de la cual se consumen principalmente los tallos en infusión para el tratamiento de afecciones en vías urinarias, inflamación, dolor, fiebre, dolor de estómago, ulcera gástrica, y diabetes (Alonso-Castro et al., 2015; Alonso-Castro et al., 2016).

Alonso-Castro y colaboradores (2016) realizaron estudios con extracto completo de *Costus pulverulentus*, en los cuales demostraron, la presencia de compuestos como campesterol, estigmasterol, β -Sitosterol, ácido vanílico, entre otros. En el ensayo de cometa con extracto de *Costus pulverulentus* indujo daño al ADN a 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y concentraciones más altas.

En la prueba de toxicidad aguda, la DL50 estimada fue $> 5000 \text{ mg} / \text{kg p.o.}$ además de mostrar efectos citotóxicos moderados en células de carcinoma de próstata. En los modelos de nocicepción inducida por productos químicos e inducción térmica, el extracto (100 y 200 $\text{mg} / \text{kg p.o.}$) mostró efectos antinociceptivos con actividad similar a 100 mg / kg de naproxeno. En la prueba de tiempo de sueño inducida por ketamina, CPE no mostró efectos sedantes.

1.3 JUSTIFICACIÓN

El uso de las plantas medicinales nació casi con el surgimiento de las diferentes culturas alrededor del mundo. Desde los tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX, por ensayo y error, el hombre ha utilizado los elementos que la naturaleza le brinda para el tratamiento de sus enfermedades, esta práctica médica pasaba y se perfeccionaba de generación en generación, por lo cual se le denominó medicina tradicional (Ramiro et al., 2007).

México cuenta con una gran diversidad de especies vegetales de origen tropical, de las cuales unas cinco mil son usadas como medicinales (Osuna et al., 2005). A pesar de que hay una gran variedad de flora usada en medicina tradicional, el 99% de estas plantas son silvestres, perenes o anuales, por lo que el porcentaje de plantas que cuentan con estudios fitoquímicos y farmacológicos es muy escaso (Osuna et al., 2005). Las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como en suburbano. Se estima que muchos mexicanos no cuentan con acceso a servicios públicos de salud. Por lo cual, tienen que recurrir a terapias alternativas. Está documentado que en México por cada médico alópata hay en promedio cuatro a cinco terapeutas tradicionales (Osuna et al., 2005).

En la Huasteca Potosina las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como en el suburbano (Alonso-Castro et al., 2012), por esto *Costus pulverulentus* es una importante alternativa de tratamiento para enfermedades infecciosas, lo anterior derivado del uso etnofarmacológico que se le da a la planta para el tratamiento de infecciones del sistema urinario y gastrointestinal. Los estudios previos mostraron diversos efectos benéficos de esta planta, sin embargo, a pesar de los antecedentes aún faltan pruebas de validación para diferentes actividades adjudicadas a *Costus pulverulentus*, entre ellas se encuentra la capacidad antimicrobiana y amebicida, la cual se sugiere derivada de los estudios fitoquímicos realizados previamente en los cuales se encontraron compuestos reportados con este efecto. Por lo anterior, es necesario validar mediante metodologías científicas las propiedades terapéuticas de la planta, así como conocer el principio bioactivo.

1.4 HIPÓTESIS

Costus pulverulentus es una planta de interés farmacológico que contiene metabolitos bioactivos en su tallo los cuales poseen actividad antimicrobiana contra bacterias de interés clínico, así como actividad anti-amebiana sobre *Entamoeba histolytica*

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano sobre bacterias de importancia clínica y anti-amebiano del Extracto Etanólico completo y fracciones orgánicas obtenidas *Costus pulverulentus* (Costaceae).

1.5.2 Objetivos específicos

- a) Obtener mediante maceración, el Extracto Etanólico de tallos secos de *C. pulverulentus* (Costaceae).
- b) Realizar el fraccionamiento primario y por cromatografía en columna del Extracto Etanólico de *C. pulverulentus* (Costaceae) a fin de obtener los metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana y anti-amebiana.
- c) Determinar la actividad Anti-Quorum Sensing y efecto antimicrobiano sobre bacterias de interés clínico y anti-amebiano de fracciones y metabolitos bioactivos de *C. pulverulentus* (Costaceae).
- d) Caracterizar mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas el extracto completo y fracciones activas para identificar los metabolitos bioactivos de *C. pulverulentus*.

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a los antibióticos, un fenómeno natural e inevitable que los microorganismos han desarrollado a lo largo de su evolución como una estrategia para sobrevivir, es un problema que amenaza muchos de los avances en la salud global (Ponce de León-Rosales et al., 2015).

A nivel mundial, la farmacorresistencia se visualiza en la población para el año 2050 como un cambio trascendental. En México hay poca literatura relacionada hacia la población para concientizar el uso de los antibióticos, así como su acción farmacológica (Fernández-Sánchez et al., 2019).

Ponce de León-Rosales y colaboradores (2015) mencionan diferentes grupos de antimicrobianos a los que los microorganismos han desarrollado resistencia. La mayoría son compuestos derivados de moléculas obtenidas naturalmente. Dentro de estos grupos se encuentran los β -lactámicos como la penicilina, polipéptidos (polimixina), aminoglucósidos (estreptomicina y vancomicina), oxazolidinona (Linezolid), tetracilina, cloranfenicol, y macrólidos (eritromicina).

2.1.1 Consecuencias de la resistencia

Las consecuencias de la resistencia microbiana incluyen elevados costos de tratamiento, un mayor tiempo de estancia hospitalaria y el aumento de la mortalidad y morbilidad por microorganismos antes no patógenos. En el entorno clínico, contribuye a la falla en el tratamiento, limita el tratamiento empírico, y lleva al uso de antibióticos menos efectivos, o con efectos secundarios poco estudiados (Ponce de León-Rosales et al., 2015).

El problema de la diseminación de genes de resistencia es global, en teoría las personas portadoras de cepas con determinantes de resistencia, incluyendo al personal de salud, se trasladan de forma habitual entre países. Se calcula que en EUA fallecen hasta 37 mil personas al año, como consecuencia de infecciones por bacterias multirresistentes. En los países de Brasil, Rusia, India y China, se encuentran las tasas más altas de personas portadoras de bacterias resistentes a β -lactámicos; estas naciones son las que más han incrementado el consumo de antibióticos en los últimos 15 años, debido al pobre control

regulatorio en el consumo, o a las condiciones insalubres que prevalecen en un gran número de ciudades. Asimismo, en la India se han identificado patógenos que muestran resistencia a carbapenemas. En ciertos países de Asia y África, existen reportes que evidencian la dispersión global de *Salmonella typhi* resistente a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol, que podría estar asociada a una mayor gravedad de la infección. Como se mencionó anteriormente, la resistencia antimicrobiana puede incrementar el costo del tratamiento de manera significativa; existen casos de tuberculosis multirresistente donde el costo de un tratamiento puede ser hasta 122 veces mayor que el dirigido a una cepa sensible (Ponce de León-Rosales et al., 2015).

En muchos países, el efecto de la resistencia a los antimicrobianos puede ser calculado. Sin embargo, de manera global es difícil de medir, ya que los datos epidemiológicos son escasos en muchas partes del mundo. Pero, los datos conocidos representan una preocupación considerable. Algunos autores hacen mención en la reciente aparición de factores de resistencia a nivel global que provienen de Estados Unidos (*Klebsiella pneumoniae* resistente al carbapenem), India (bacterias con el gen bla_{NDM-1} mediado por plásmido que confiere resistencia a las carbapenemas) y de otros lugares (el gen mcr-1 de *E. coli* mediado por plásmidos que confiere resistencia a la colistina, descrito originalmente en China) demostrando de manera generalizada el problema y la importancia de mejorar la vigilancia mundial (Marston et al., 2016).

Cabe mencionar que un obstáculo importante que enfrentan algunos países con economías medias es la falta de información específica y adecuada para determinar la magnitud de las infecciones por microorganismos resistentes. La mayor parte de América Latina no cuenta con programas de vigilancia eficaz para medir la resistencia antimicrobiana, y la información epidemiológica asequible es limitada con una distribución que podría no representar al conjunto de la población. Estudios muestran que, en América Latina la tasa de resistencia de enterococo resistente a la vancomicina ha escalado hasta alcanzar el 14%. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA-AH) asociado a tratamiento hospitalario muestra un porcentaje de resistencia de 48, y 21% en portadores sanos de cepas (MRSA-AC) aislados en la comunidad en México. En México, la tasa de resistencia en infecciones del tracto urinario alcanza el 49% (Ponce de León-Rosales et al., 2015).

2.1.2 Causas/factores de la resistencia

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en una irresponsabilidad compartida por los profesionales sanitarios, los ciudadanos y los políticos. Por una parte, el personal médico hace caso omiso a las guías clínicas para iniciar el tratamiento empírico y se salta las escalas de tratamiento; la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), estima que entre el 40 y el 50% de los antibióticos prescritos en los servicios de atención primaria y hospitalaria son inadecuados. Cabe mencionar, que en ocasiones existe un exceso de prescripción de antibióticos para tratar afecciones que no los requieren (Angeles et al., 2020). Además, otras situaciones que enfrentan los médicos en la práctica diaria son el desconocimiento y la falta de confianza, debido a que algunos de ellos no están seguros del diagnóstico en pacientes febriles y deciden prescribir algún antibiótico para no perder la confianza del paciente. Lo mismo suele suceder cuando se sienten presionados por el paciente y/o sus familiares, llegando a prescribir medicamentos de forma errónea (González-Mendoza et al., 2019).

Los ciudadanos, como responsables de dicha crisis, llevan a cabo acciones que favorece el desarrollo de la resistencia a fármacos, como incumplir la prescripción facultativa, cambiar la dosificación, interrumpir la duración del tratamiento por la disminución o mejoramiento de los síntomas, automedicarse, y recomendar a otra persona lo que a ellos les funcionó (Angeles et al., 2020).

Aunque la causa original de la resistencia es propia de la evolución bacteriana en el mundo, numerosos factores relacionados con prácticas y condiciones sociales, aceleran este proceso, tales como la sobreutilización de antibióticos en la práctica con pacientes ambulatorios y hospitalizados, el incremento en la expectativa de vida con un mayor uso de antibióticos en la vejez y el uso de estos en la industria agropecuaria para la producción de alimentos (Ponce de León-Rosales et al., 2015).

La resistencia a los antimicrobianos ha sido impulsada por la prescripción y venta inapropiada de antibióticos, el uso de antibióticos fuera del sector de salud y los factores genéticos propios de las bacterias (Marston et al., 2016).

Cabe mencionar que el mayor consumo de antibióticos no se da en la medicina, sino en la agroindustria, utilizados como promotores de crecimiento, de modo que el sector agroindustrial es el principal generador de resistencia. Dicho esto, es indispensable que se

desarrollen políticas que prohíban el uso pecuario de los antibióticos en la producción de alimentos como se ha hecho en los países europeos, restringiendo su uso terapéutico exclusivamente para los humanos y veterinaria. Otro factor que se ve implícito en el incremento de la resistencia, es la decadente investigación, desarrollo y aprobación de nuevos antibióticos (Ponce de León-Rosales et al., 2015).

El uso de los antibióticos en los Estados Unidos, para la alimentación de los animales, representa el 80% de todos los antibióticos consumidos. La FDA (Food and Drug Administration) considera que el 74% de estas sustancias químicas se administra con el alimento como un método para promover el crecimiento de los animales, y no para tratar una infección. Por otro lado, el 62% de los antibióticos usados en animales, representa compuestos de importancia médica, es decir, son importantes para el tratamiento de las enfermedades humanas (Marston et al., 2016).

Otra situación que está llamando cada vez más atención es el enorme uso de antibióticos en la ganadería y – en un grado algo menor – en la agricultura. Ello se traduce en enormes cantidades de antibióticos liberadas hacia el medio ambiente, generando una presión selectiva a favor de los microorganismos resistentes.

Se ha reportado que cerca del 80% de los antibióticos que se consumen en los Estados Unidos se utilizan en la agricultura y la acuicultura. En las granjas, estos compuestos forman parte de los programas de engorda y mejoramiento de los animales; también se añaden a la alimentación de los salmones de crianza. Las dosis subterapéuticas de los antibióticos que ingieren los consumidores son suficientes para generar poblaciones menos vulnerables en las bacterias que sobreviven. A su vez, éstas intercambian genes que confieren resistencia, dando origen a nuevas cepas de bacterias multirresistentes, las cuales, bajo determinadas circunstancias, causarán infecciones serias y potencialmente letales (González-Mendoza et al., 2019).

2.1.3 Tipos de resistencia

La resistencia puede ser natural o intrínseca, que corresponde a una propiedad específica de las bacterias y aparece antes de la utilización del antibiótico. En cambio, la resistencia adquirida, se presenta por cambios puntuales en el ADN, como es el caso de la mutación, o por la inserción de material genético por medio de plásmidos y transposones. Algunos de

estos poseen elementos génicos conocidos como integrones, que les permite detener varios genes exógenos ordenando la aparición de una resistencia a varios antibióticos, a esto se le denomina resistencia múltiple. Otras denominaciones de resistencia son la relativa o intermedia, en este tipo de resistencia hay un aumento gradual de la CMI (concentración mínima inhibitoria) a través del tiempo. La resistencia o sensibilidad del microorganismo en este caso, dependerá de la concentración. Por otra parte, la resistencia absoluta se genera por un aumento súbito en la CMI de un cultivo y se puede presentar durante o después de la terapia antimicrobiana; en este caso el aumento de la dosis del antibiótico no es tan efectiva (Hernández-Calderón y Hernández-González, 2016).

La tolerancia antibiótica es un término que hace referencia al fenómeno presentado por la CMI y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Cuando la relación CMB/CMI es mayor a 8, se presenta la denominada persistencia del microorganismo (Hernández-Calderón y Hernández-González, 2016).

2.1.4 Resistencia de los microorganismos patógenos oportunistas en la actualidad

La resistencia a antimicrobianos se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antiparasitarios), este cambio aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas de los microorganismos, aunque muchas veces el proceso se ve acelerado debido al mal uso y el abuso de los antimicrobianos. Por este motivo los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación entre la población. El 27 de febrero del 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana (Tabla 1). El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos (OMS, 2017). Estas bacterias han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (los cuales son los mejores antibióticos disponibles para tratar este tipo de bacterias) (Lawe y Bennett, 2017).

Tabla 1. Bacterias de importancia médica resistentes a antimicrobianos

Bacteria	Resistencia	Prioridad
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos	Crítica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos	Crítica
Familia Enterobacteriaceae (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Proteus</i> sp., <i>Serratia marcescens</i>)	Carbapenémicos productoras de ESBL	Crítica
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina	Elevada
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, Vancomicina	Elevada
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina	Elevada
<i>Campylobacter</i> sp.	Fluoroquinolonas	Elevada
<i>Salmonella</i> sp.	Fluoroquinolonas	Elevada
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina, Fluoroquinolonas	Elevada
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina	Media
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina	Media
<i>Shigella</i> sp.	Fluoroquinolonas	Media

(OMS,2017).

2.1.4.1 Infección en vías urinarias

Las infecciones de las vías urinarias (IVUs) son algunas de las infecciones bacterianas más comunes, que afectan 150 millones de personas cada año en todo el mundo. Las infecciones urinarias son una causa importante de morbilidad en niños pequeños, hombres mayores y mujeres de todas las edades. Las secuelas graves incluyen frecuentes recurrencias, pielonefritis con sepsis, daño renal en niños pequeños, parto prematuro y complicaciones causadas por el uso frecuente de antimicrobianos (Flores-Mireles et al., 2015).

Las IVUs son causadas por bacterias Gram-negativas y Gram positivas, así como también por ciertos hongos. El agente causal más común para las infecciones urinarias complicadas y no complicadas es la *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Para los agentes involucrados en IVUs no complicadas, *E. coli* UPEC es el patógeno principal, seguido en la prevalencia de por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*,

Streptococcus del grupo B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* sp. (Flores-Mireles et al., 2015). En lo que respecta a las IVUs complicadas, *E. coli* UPEC es el patógeno principal seguido por *Enterococcus* sp., *K. pneumoniae*, *Candida* sp., *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *Streptococcus* del grupo B.

Los pacientes que padecen una infección urinaria sintomática se tratan comúnmente con antibióticos. Estos tratamientos pueden provocar la alteración a largo plazo de la microbiota normal de la vagina y el tracto gastrointestinal y el desarrollo de microorganismos resistentes a múltiples fármacos. La disponibilidad de nichos que ya no están llenos por la microbiota alterada puede aumentar el riesgo de colonización con uropatógenos resistentes a múltiples fármacos. Es importante destacar que la "era dorada" de los antibióticos está disminuyendo, y la necesidad de tratamientos racionalmente diseñados y alternativos va en aumento (Flores-Mireles et al., 2015).

2.1.4.2 Amebiasis

La amebiasis es una de las parasitosis que causan más muertes a nivel mundial, reportándose cada año 50,000 millones de casos y aproximadamente 70,000 decesos. Es causada por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), un protozooario intestinal del hombre, con potente actividad citotóxica y citolítica, que le permite perforar el intestino e invadir otros órganos, como el caso del hígado, causando absceso hepático amebiano. Los índices más altos de infección por amebiasis corresponden a la India, África, Centroamérica, Sudamérica y México (Prakash y Bhimji, 2018). En la semana epidemiológica del 3 al 9 de mayo de 2020, se reportaron 60675 y 243 casos de amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano, respectivamente (Boletín epidemiológico 2020). Esta parasitosis se ha tratado con un limitado número de nitroimidazoles, siendo el metronidazol [1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol] el más utilizado. Sin embargo, éste compuesto se ha asociado con efectos adversos, tales como convulsiones, ataxia, neuropatía periférica, miopía transitoria, irritación gástrica, daño a los espermatozoides, hematuria y son potencialmente carcinogénicos (Bendesky et al., 2002; Dobias et al., 1994; Finegold, 1980; Kusumi et al., 1980; Rosenblatt y Edson, 1983). Así mismo, los efectos adversos en animales también han sido bien documentados, tales como vómito, hepatotoxicidad, neutropenia, convulsiones, ataxia,

rigidez y toxicidad neurológica (Caylor y Cassimatis, 2001; Dow et al., 1989). Adicionalmente, el uso indiscriminado de estos fármacos está dando como consecuencia la aparición de cepas resistentes de *E. histolytica* (Bansal et al., 2006; Genetu Bayih et al., 2017).

La resistencia a los anti-parasitarios es atribuida principalmente al incremento de la población susceptible a infecciones oportunistas (pacientes con VIH, trasplantados o sometidos a quimioterapia contra el cáncer), que se encuentran en riesgo creciente de adquirir infecciones oportunistas; así como la automedicación en la población general. Todos estos factores pueden contribuir a afectar seriamente el control de la enfermedad, cuyo manejo médico puede llegar a ser complejo y costoso. Por lo tanto, debido a la inminente resistencia de *E. histolytica* ante los amebicidas se han comenzado a desarrollar nuevos fármacos, que hasta ahora solo han presentado moderada actividad (Hayat et al., 2016), por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos efectivos y seguros debe continuar.

2.2 Investigaciones y tratamiento alternativos

Ante la ineficacia de muchos de los tratamientos y la dificultad de acceso a centros médicos principalmente en países subdesarrollados se han implementado estrategias que permitan a las personas a acceder a tratamientos efectivos para sus padecimientos, entre ellos los de gran importancia médica como los procesos infecciosos (OMS, 2013).

La Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional (2013) establece las directrices para desarrollar políticas dinámicas y aplicar planes de acción que refuercen el papel de la medicina tradicional en el mantenimiento de la salud de las personas. Los protocolos se orientan a profundizar la estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005, en cuyo marco se examinó la situación de la medicina tradicional en el mundo y en los Estados Miembros, y se establecieron cuatro objetivos básicos, a saber:

- 1- Política: cuando sea posible, integrar la medicina tradicional en los sistemas nacionales de salud mediante el desarrollo y la aplicación de políticas y programas nacionales sobre medicina tradicional.

- 2- Seguridad, eficacia y calidad: promover la seguridad, eficacia y calidad de la medicina tradicional mediante la ampliación de la base de conocimientos y la prestación de asesoramiento sobre normas reglamentarias y de garantía de la calidad;
- 3- Acceso: mejorar la disponibilidad y asequibilidad de la medicina tradicional, y especialmente el acceso de las personas pobres;
- 4- Uso racional: promover el uso terapéutico racional de la medicina tradicional entre los profesionales y los usuarios.

2.2.1 Herbolaría

Entre las estrategias aceptadas y más difundidas en todo el mundo se encuentran los tratamientos herbolarios, éstos implican el uso de plantas consideradas medicinales completas o partes de ellas para el tratamiento de afecciones en humanos y animales.

2.2.1.1 Tratamientos herbolarios en México

México es un país con una amplia variedad de plantas medicinales y aromáticas; su uso está arraigado en su cultura, y se emplean para resolver problemas de salud en áreas con poco acceso a medicamentos. Aunque hay varias especies introducidas, México tiene una gran cantidad de plantas endémicas que se consideran medicinales.

La demanda de plantas medicinales aumenta con el mercado, que es amplio (Rosete et al., 2013). Son plantas que producen metabolitos secundarios, cada una con diferentes ingredientes activos y diferentes propiedades terapéuticas (Bourgaud et al., 2001). Sin embargo, la información fitoquímica generalmente se centra en las especies introducidas. México tiene especies medicinales y aromáticas que requieren investigación científica y una difusión más amplia. El área cultivada en el país es más pequeña que la demanda allí, y la mayoría de las plantas se cultivan comercialmente. Con estos antecedentes, es vital reunir información sobre especies endémicas de México que son importantes para la agricultura, la farmacia, la cosmética, etc. debido a sus propiedades fitoquímicas y farmacológicas.

México tiene un estimado de 30,000 especies de plantas, donde aproximadamente 3,000 a 5,000 son de uso medicinal (Villaseñor, 2016). La mayoría de las plantas medicinales se recolectan de la naturaleza, y solo el 15% se cultiva. Anualmente se exportan alrededor de 50,000 toneladas, pero no hay datos precisos sobre especies endémicas. El mayor porcentaje de plantas medicinales y aromáticas se vende en los mercados locales. Su comercialización es económicamente prometedora debido a su uso generalizado en la medicina herbal, y debido a la actividad biológica que, han demostrado en algunas investigaciones.

El uso tradicional de plantas medicinales ha generado interés en comenzar la investigación para mantener un uso sostenible de varias especies. Al menos 119 especies de plantas se utilizan en el tratamiento empírico de enfermedades con síntomas similares a los del cáncer (Jacobo-Herrera et al., 2016). Se ha reportado actividad antibacteriana de 75 especies de plantas, y 225 compuestos y 140 especies (40.57%) se han reportado como tóxicos al menos una vez.

En la Huasteca Potosina hay una gran diversidad de especies vegetales cuyo uso ha sido practicado por la etnia Tenek desde hace mucho, sin embargo, algunas de estas especies carecen de estudios científicos que avalen sus propiedades empíricas medicinales (Alonso-Castro et al., 2012).

2.3 Importancia del estudio de plantas medicinales

El hombre ha utilizado las plantas desde la antigüedad, en un inicio como fuente de alimento, y posteriormente, por sus propiedades medicinales, parte de esta flora llegó a ser un recurso útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluso mucho antes que la humanidad descubriera la existencia de los microbios como agentes etiológicos (Ríos y Recio, 2005; Azmir et al., 2013). Una planta medicinal se define como aquella que, en uno o varios de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, o que son precursores para su síntesis química (Doughari, 2012).

De esta manera, el empleo de plantas medicinales para el cuidado de la salud ha permitido el aislamiento y caracterización de nuevos compuestos activos. En 1805, la morfina se convirtió en el primer compuesto activo aislado de una planta; posteriormente se realizó el aislamiento de los primeros fármacos como la cocaína, digitoxina y la quinina (Balunas y Kinghorn, 2005).

Actualmente, el aislamiento y caracterización de compuestos con actividad farmacológica a partir de plantas se ha incrementado, lo que ha llevado al desarrollo de nuevos compuestos benéficos para el ser humano; tal es el caso de la artemisinina, una sesquiterpenlactona aislada de la planta medicinal china *Artemisia annua* L. (Asteraceae) con potente actividad antimalárica (Balunas & Kinghorn, 2005), el paclitaxel aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* Nutt. con actividad anticancerígena (Salim et al., 2008), el ácido salicílico aislado de la corteza del sauce blanco (*Salix alba*) con propiedad antiqueratolítica, antiagregante y antipirética (Lüllman, Mohr, y Hein, 2010).

Por otra parte, la búsqueda de antimicrobianos naturales con aplicación en la industria alimentaria es alentada por la alta prevalencia de enfermedades transmitidas por los alimentos y la actual preferencia popular de consumir sólo alimentos naturales (Rasooli, 2007). Por lo anterior, algunos antimicrobianos naturales como los aceites esenciales y las hierbas son usados por sus propiedades y pueden tener aplicación como conservadores naturales y así evitar el procesamiento físico excesivo utilizado para garantizar la seguridad microbiana (Juneja et al., 2012).

2.3.1 Metabolitos de plantas

Las células vegetales procesan diversos compuestos químicos para su supervivencia y subsistencia, los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: los metabolitos primarios y secundarios. Los primeros, se destinan al crecimiento y al desarrollo (hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas y lípidos); mientras que los segundos derivan biosintéticamente de los metabolitos primarios. Éstos últimos actúan como defensa (contra los herbívoros, los microbios, los virus o demás plantas competidoras), como compuestos de señal (para atraer animales polinizadores o dispersores de semillas), y como protección de la radiación ultravioleta y los oxidantes (Harborne, 1993; Lattazio, 2013).

El efecto curativo de las hierbas medicinales está dado por la gran variedad de metabolitos secundarios (Ávila, 2012) en cuya síntesis se ven implicadas cuatro vías principales: (1) la ruta del ácido shikímico, (2) la ruta del ácido malónico, (3) la ruta del ácido mevalónico y (4) la ruta del no-mevalonato (2C-metil-D-eritritol-4-Fosfato MEP) (Figura 1) (Tiaz y Zeiger, 2006); estas rutas, dan origen a tres grupos de compuestos químicamente distintos: los terpenos, los compuestos fenólicos, y los compuestos nitrogenados (Taiz y Zeiger, 2006; Croteau *et al.*, 2000; Brahmshatriya y Brahmshatriya, 2008).

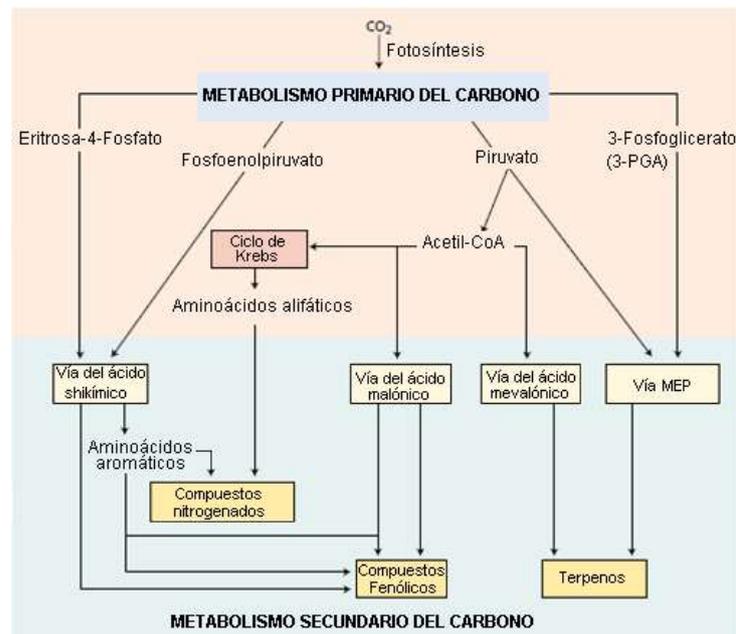


Figura 1. Principales vías para la biosíntesis de metabolitos secundarios y su relación con el metabolismo primario (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2006).

2.3.1.1 Compuestos fenólicos

Estos compuestos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios en las plantas y tienen un papel clave como compuestos de defensa cuando el estrés ambiental (la luz alta, la baja temperatura, la infección por patógenos, herbívoros y la deficiencia de nutrientes) conduce a un aumento de la producción de radicales libres y otras especies oxidativas (Lattanzio, 2013). Además, éstos compuestos actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (Creus, 2004).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar en su estructura un anillo de benceno con, al menos, un grupo hidroxilo (fenólico), generalmente funcionalizado. En la naturaleza, la síntesis del anillo aromático la realizan únicamente los vegetales y microorganismos, y las vías de síntesis más frecuentes son la vía del acetato y la del shikimato (ácido shikímico) (Castillo y Martínez, 2007). Los compuestos fenólicos se pueden clasificar según su complejidad estructural y su origen biosintético.

El grupo más sencillo corresponde a los fenoles propiamente dichos: ácidos fenólicos y cetonas polifenólicas. Los ácidos fenólicos son de interés terapéutico y de acuerdo a su estructura se han clasificado en dos grupos, los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. La relación estructura-función demuestra que los ácidos hidroxicinámicos son más efectivos en términos de la actividad antioxidante que los ácidos hidroxibenzoicos (Dziedzic y Hudson 1984). Los ácidos hidroxibenzoicos (ejemplo ácido vanílico, ácido gálico, ácido protocatecuico) son compuestos que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y grupos hidroxilo en un anillo aromático, mientras que los ácidos hidroxicinámicos (ejemplo ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido clorogénico) se caracterizan por la presencia del grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en remplazo del grupo COOH presente en los ácidos hidroxibenzoico (Figura 2). El doble enlace carbono ($\text{C}=\text{C}$) de la cadena aumenta la resonancia química, que puede ser descrita como una deslocalización de los electrones en los enlaces π estabilizando los radicales libres y por lo tanto incrementa la capacidad antioxidante de la molécula (Peñarrieta et al., 2014).

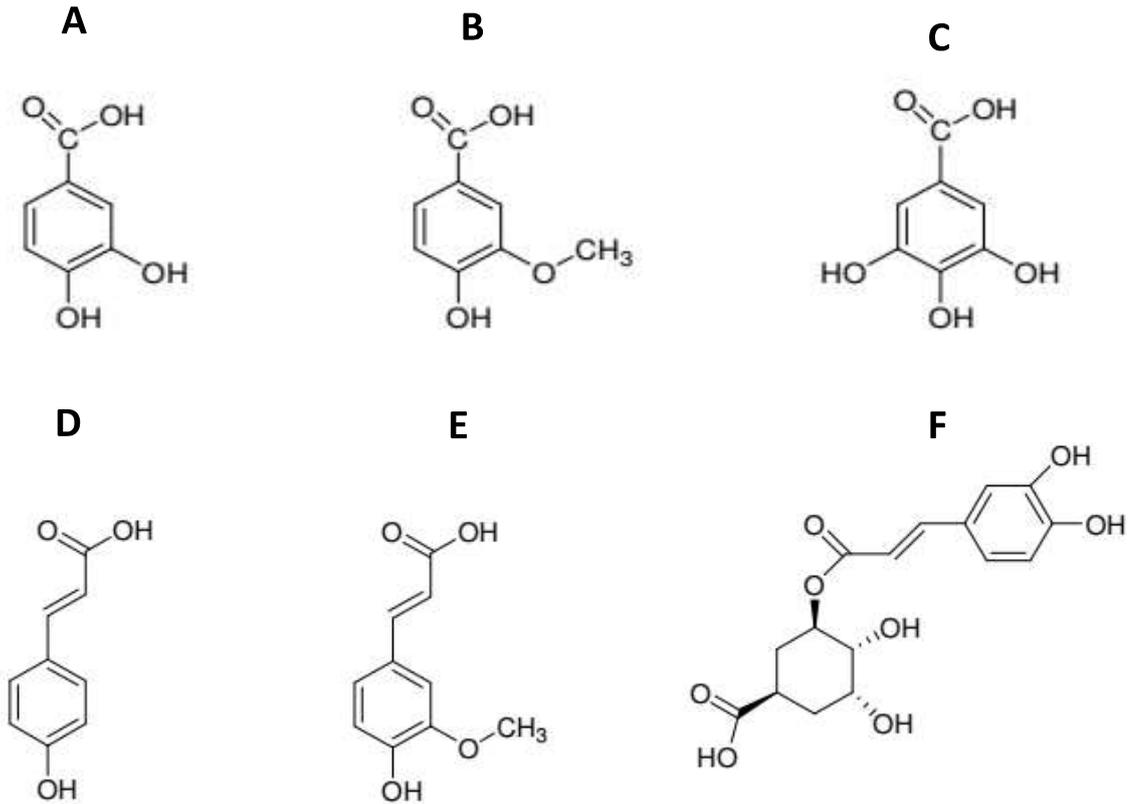


Figura 2. Estructuras químicas de ácidos fenólicos. Ácidos hidroxibenzoicos, A) ácido protocatecuico, B) ácido vanílico, c) ácido gálico. Ácidos hidroxicinámicos, D) ácido p-cumárico, E) ácido ferúlico, F) ácido clorogénico. (Tomado y modificado de Peñarrieta et al. 2014).

Otro grupo de compuestos fenólicos son los fenilpropanoides, basados en un núcleo C_6C_3 , son un amplio grupo constituido por diferentes compuestos: cumarinas, cromonas, benzofuranos y lignanos. Otros tres grupos de compuestos fenólicos que cabe considerar incluyen las xantonas (con un esqueleto $C_6C_3C_6$), los estilbenos (con un esqueleto $C_6C_2C_6$) y las quinonas (benzo-, nafto- y antroquinonas). Por último, destacan los flavonoides, que suponen aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos presentes en las plantas y que se pueden clasificar en 5 grupos diferentes: antocianinas (pigmentos), flavonoides menores (que incluyen flavononas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas), flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados (Castillo y Martínez, 2007).

2.4 Actividad biológica de extractos vegetales

Las plantas medicinales se usan tradicionalmente en todo el mundo como remedios para el tratamiento de diversas enfermedades, incluidos el asma, los síntomas gastrointestinales, los trastornos de la piel, los problemas respiratorios y urinarios y las enfermedades hepáticas y cardiovasculares (Duraipandiyan et al., 2012).

Estudios previos han demostrado el potencial antimicrobiano de *Oxalis corniculata* contra *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *B. cereus*. Este potencial es atribuido a la presencia de carbohidratos, glicósidos, fitoesteroles, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y compuestos volátiles (Rahman et al., 2017). Por otra parte, los extractos etanólicos de *Punica granatum*, *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinale* y *Thymus vulgaris* ejercen actividad antimicrobiana significativa contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* (Mostafa et al., 2018).

En lo que respecta a la actividad antiamebiana, se ha demostrado que la berberina y la jatrorrizina presente en el extracto metanólico de *Argemone mexicana* presentan actividad antiamebiana contra en *E. histolytica* HM1-IMSS (Elizondo-Luévano, 2018). De igual manera, los extractos de cloroformo de *Alpinia galanga*, *Barleria lupulina*, *Boesenbergia pandurata*, *Piper betle* y *Piper chaba* muestran actividad significativa contra *E. histolytica* HM1-IMSS (Sawangjaroen et al., 2006). Así mismo se han documentado extractos orgánicos, acuosos y/o compuestos puros obtenidos a partir de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de parasitosis (Sharma et al., 2001).

2.4.1 *Costus pulverulentus* (Costaceae)

En particular, el género *Costus* comprende unas 70 especies, las cuales se encuentran distribuidas en zonas de alta precipitación, humedad y temperatura cálida. Entre estas especies destaca *Costus pulverulentus*, comúnmente conocida como caña de puerco, caña de jabalí o caña agria, la cual se encuentra distribuida desde México, América Central y el Caribe hasta la costa oeste de Sudamérica.

Costus pulverulentus es una planta usada para el tratamiento empírico de afecciones en vías urinarias, inflamación, dolor, fiebre, dolor de estómago, ulcera gástrica, y diabetes. Es una

planta rizomatosa conocida comúnmente como “caña de puerco” o “caña agria”, haciendo alusión a la forma de sus tallos y al sabor del jugo de sabia. Es una planta erecta, de 0.4 a 1.5 m de alto, vainas foliares de 1.2 a 6.1 cm de largo y 0.4 a 1.6 cm de diámetro, glabras a vilosas, lígulas truncadas o ligeramente bilobadas, de 0.7 a 1 cm de largo, peciolos de 0.4 a 1.5 cm de largo, laminas angostamente elípticas a obovadas, de 6.5 a 26 cm de largo y de 3 a 9 cm de ancho, ápice cortamente acuminado, base cuneada a redondeada, haz glabro a raramente viloso, envés glabro, puberulento o viloso; inflorescencias fusiformes, de apéndice manifiestamente agudo de 4 a 13.5 cm de largo, de 3.5 a 5 cm de diámetro, brácteas ovado-trianguulares, de 2.5 a 3.6 cm de largo y 1.9 a 2.7 cm de ancho, agudas, márgenes comúnmente lacerándose en fibras, rojas a anaranjado-rojas, ocasionalmente verdosas en las partes expuestas, bractéolas naviculares de 1.5 a 2 cm de largo y 0.4 a 0.6 cm de ancho, rojas a rojas-anaranjadas glabras a escasamente seríceas; cáliz rojo, de 0.6 a 1 cm de largo, sus lóbulos deltoides de 0.3 a 0.4 cm de largo y 0.4 a 0.6 cm de ancho en la base, márgenes a menudo lacerándose en fibras, corola roja, roja-anaranjada a amarilla de 4 a 5 cm de largo, tubo de 1.2 a 1.8 cm de largo, ovario glabro de 0.6 a 1 cm de largo; cápsula elipsoide de 1.5 cm de largo; semillas negras (ver Figura 3) (Vovides, 1993).



Figura 3. Morfología *Costus pulverulentus* A) Hojas B) Flor C) y D) Tallo.

2.4.1.1 Taxonomía

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Liliales Takht.

Orden: Zingiberales Griseb.

Familia: Costaceae Nakai

Géneros: *Costus* L.

Especie: *Costus pulverulentus* C. Presl

2.4.1.2 Localización

En México se ha identificado en los estados de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán, en regiones de bosque subtropical subcaducifolio y en bosque de encino en altitudes de 250-980 msnm, por lo general cerca de las orillas de arroyos. Se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales de América Central, desde Belice hasta Venezuela (Trópicos).

2.4.1.3 Etnofarmacología y fitoquímica

Dentro de la etnobotánica, en Puebla se ha indicado masticar el tallo a quien padece mal de orín, sin embargo, no se han detectado antecedentes de su uso medicinal ni estudios químicos o farmacológicos que corroboren su efectividad según la biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana (2009). En la Huasteca Potosina, su uso se ha extendido para el tratamiento del “mal de orín”. Sin embargo, hasta el momento son pocos los estudios relacionados con efectos farmacológicos de la planta.

La caracterización química del Extracto Etanólico de *Costus pulverulentus*, reveló la presencia de compuestos fenólicos (hidroquinona), ácidos hidroxibenzoicos (ácido vanílico y siringico), fenilpropanoides (ácido cinámico e hidroxicinámico), ácido dicarboxílicos (ácido málico), fitosteroles (campesterol, estigmasterol y β -sitosterol) (Alonso-Castro et al. 2016). Se ha reportado que estos compuestos ejercen efecto antiinflamatorio y antinociceptivo mediante la inhibición de la fosfolipasa A2, inhibición de la activación del factor transcripcional $\text{Nf-}\kappa\beta$, lo que a su vez inhibe la liberación de los mediadores de

inflamación (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12) y la síntesis de prostaglandinas (Paniagua Pérez 2017, Valerio and Awad 2011, Liu et al., 2019; Santos et al., 2013; Walker et al., 2017; Novotny et al., 2017). Debido a estos componentes, *C. pulverulentus* ejerce actividad antiinflamatoria, antinociceptiva y citotóxica en células de carcinoma de próstata PC3 (Alonso-Castro et al., 2016). Adicionalmente se ha demostrado la inocuidad de la planta mediante estudios de toxicidad aguda, estimando una DL₅₀ > 5000 mg/kg por vía oral (Alonso-Castro et al., 2016).

CAPITULO III METODOLOGÍA

3.1 Colecta de material vegetal

Se colectaron plantas adultas de *Costus pulverulentus* (baucher del espécimen SLPM-033070, Herbario Isidro Palacios, Instituto de Zonas de Desérticas, UASLP) de 1 a 1.5 m de altura en tres muestreos durante los meses marzo-junio en el municipio de Ciudad Valles, San Luis Potosí en las coordenadas geográficas 21°49'39.4"N 99°05'18.9"W (Figura 4). La colecta se realizó de forma manual usando un cuchillo para su corte, siguiendo el protocolo para la colecta de material vegetal silvestre establecido en el Proyecto de Norma 005-SEMARNAT-2012. Las plantas se trasladaron posteriormente al Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca de la UASLP para su procesamiento.

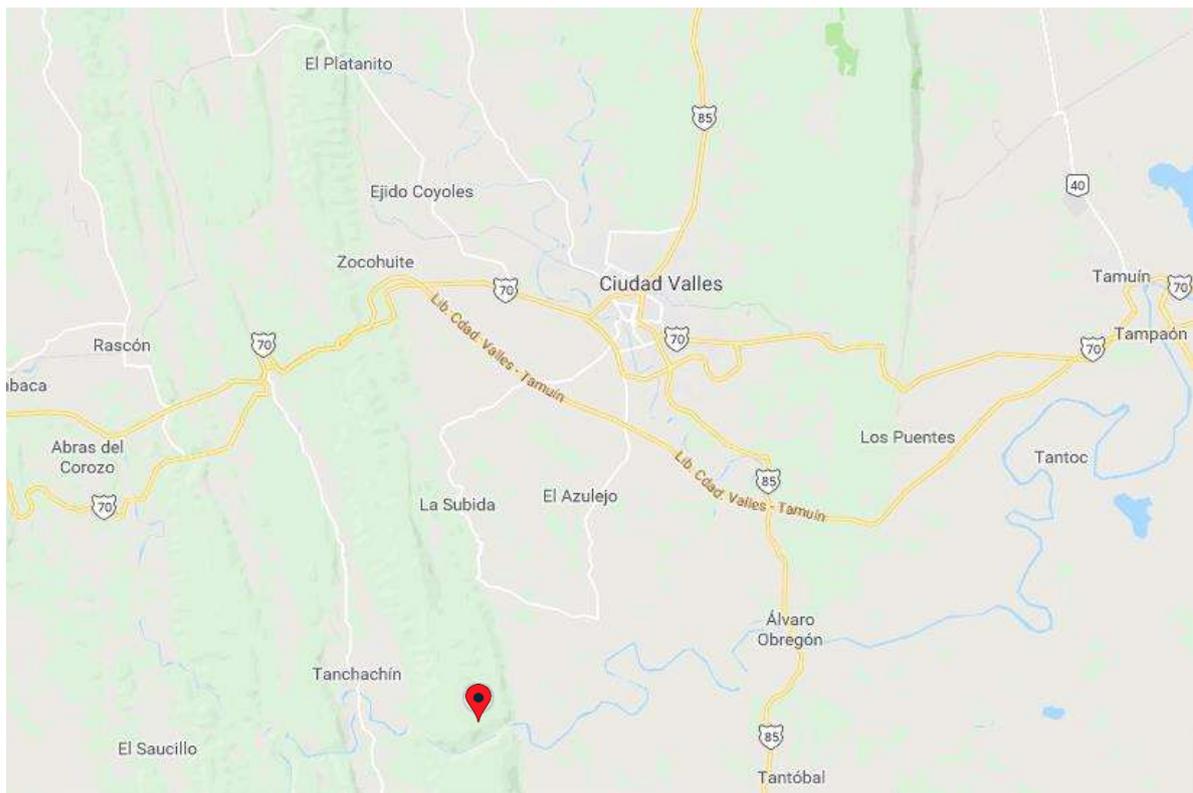


Figura 4. Sitio de colecta de plantas de *C. pulverulentus*.

3.2 Procesamiento de material vegetal

Se recuperaron los tallos de las plantas, los cuales fueron seccionados en fragmentos de 0.5 a 1 cm de espesor utilizando un cuchillo de acero. Los fragmentos se colocaron en charolas de aluminio y se llevaron a secado en una estufa de convección (LINDBERG/BLUE) a 50 °C, durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de secado los tallos se pulverizaron en un molino analítico (IKA-WERKE®, U.S.A, Modelo: M20 S003) hasta obtener polvo fino.

3.4 Elaboración del extracto

El Extracto Etanólico (E.E.) completo se obtuvo mediante maceración a temperatura ambiente y protegido de la luz durante un periodo de 7 días (Temperatura de laboratorio 30 ± 5 °C). Para ello se pesaron 100 g de planta seca y molida, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2000 mL y se les adicionaron 900 mL de etanol absoluto (Meyer). El Extracto Etanólico se filtró y posteriormente se concentró en rotavapor R-100 (BUCHI®) a 40 °C a 175 mbar de presión. El extracto fue concentrado hasta un volumen de 50 mL y se vertió en un vaso de precipitados de 100 mL, se llevó a sequedad total en estufa de convección (LINDBERG/BLUE) a 50 °C durante 24 h, finalmente el extracto seco se pesó en una balanza analítica. El proceso se repitió tres veces para determinar el rendimiento por 100 gr de planta seca. Posteriormente se procesaron 25 kilogramos de planta para obtener la mayor cantidad de Extracto Etanólico.

3.5 Fraccionamiento del extracto

El E.E. fue fraccionado utilizando solventes de diferente polaridad hexano (Jalmek) < cloroformo (Jalmek) < acetato de etilo (CTR Scientific) < acetona (CTR Scientific) < etanol (Jalmek) < metanol (Tedia) (figura 5). El residuo seco del E.E. se disolvió en 50 ml de Hexano, se obtuvieron dos fracciones, soluble e insoluble. La fracción soluble se recuperó y se llevó a sequedad en la estufa de convección. El residuo seco se pesó para determinar el rendimiento, posteriormente se disolvió en etanol absoluto y se calculó la concentración en mg/mL. Por otra parte, la fracción insoluble en hexano (residuo) se llevó a sequedad total a 45 °C durante 48 h y se disolvió en cloroformo. De igual manera se obtuvieron dos fracciones (soluble e insoluble). La fracción soluble se recuperó y se secó en la estufa de convección y se pesó para calcular el rendimiento. La fracción clorofórmica se disolvió en etanol absoluto

y se calculó la concentración en mg/mL. La fracción insoluble en cloroformo (residuo) se procesó de igual manera, secado y tratamiento con el siguiente solvente en el orden de polaridad establecido.

Para las fracciones de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol se siguió el procedimiento descrito anteriormente, de acuerdo a lo mostrado en la Figura 5. Las fracciones orgánicas se pesaron y la concentración se determinó como mg de extracto seco por mL de solvente utilizado (etanol absoluto).

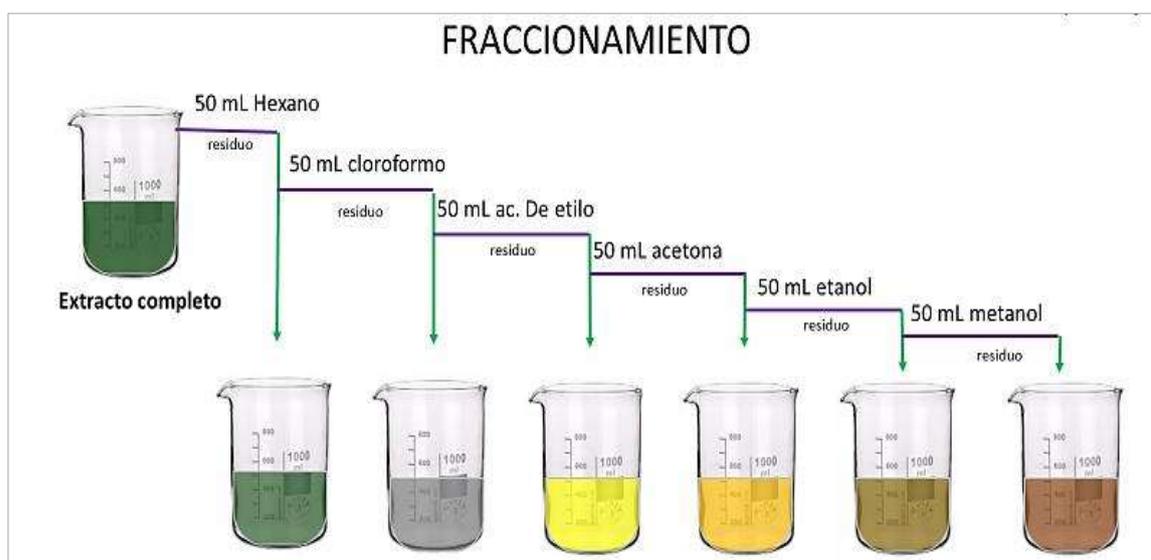


Figura 5. Proceso de fraccionamiento primario del Extracto Etanólico (EE) de *Costus pulverulentus*.

3.5 Cromatografía en columna para el fraccionamiento del extracto

Se utilizó una columna de vidrio de 22 x 450 mm, empacada con una suspensión de 21.5 g de Silica Gel 70-230 mesh, 63-200 μm (Sigma 60741) en 100 mL de hexano. La columna se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se cargó con 250 mg de la muestra. La fase móvil consistió en el sistema de solventes formado por Hex: AceOEt: MeOH con diferente polaridad (Tabla 2). La resolución de la muestra se llevó a cabo con un flujo de 60 gotas/min. Se recolectaron fracciones de 50 ml, las cuales se concentraron utilizando el Rotavapor R-100 (BUCHI). Posteriormente, las fracciones se analizaron mediante cromatografía en capa fina.

Tabla 2. Sistema de solventes empleado en la Cromatografía en Columna

Hexano (ml)	Acetato de etilo (ml)	Metanol (ml)
100	0	0
90	10	0
80	20	0.1
70	30	0.2
60	40	0.3
50	50	0.4
40	60	0.5
30	70	0.6
20	80	0.7
10	90	0.8
0	100	0.9

3.6 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizaron placas de Silica gel 60 UV-254 como fase estacionaria y cinco sistemas de solventes formados por Hex: AceOEt: MeOH en relación 90:10:0, 80:20:0.1, 70:30:0.2, 60:40:0.3 y 50:50:0.4. La muestra se aplicó a 1 cm del extremo inferior de la placa y se resolvió durante 45 minutos en una cámara cromatográfica. Las placas se retiraron de la cámara, se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se visualizaron bajo luz UV a 254 y 365 nm. Se midió la distancia de migración de las bandas observadas, así como el frente de corrida. Con los valores obtenidos se determinaron los RF (Factor de retención), utilizando la siguiente ecuación:

$$RF = \frac{\text{distancia de banda}}{\text{frente de corrida}}$$

3.7 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

Los extractos, fracciones orgánicas y Fracciones activas obtenidas del fraccionamiento en columna se derivatizaron utilizando la siguiente metodología. 50 µL de extracto se secaron mediante un flujo de nitrógeno. Posteriormente, se añadieron 20 µL de piridina (Sigma 270407) y 80 µL del reactivo BSTFA con 1 % de TMCS (Sigma 15238) y se incubó a 85 °C durante 25 min. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió Isooctano (Sigma 650439) hasta un volumen final de 200 µl. Finalmente, 100 µL de la mezcla transparente se transfirieron a un vial y se analizaron por GC-MS. Para el análisis se utilizó

un Cromatógrafo de Gases modelo GC9090A (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975 (Agilent Technologies). Se analizó 1 μ L del derivatizado en modo de inyección dividida pulsada con una relación de 5:1. La temperatura del inyector fue de 250 °C. La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar Agilent JyW DB-1MSUI (60 m x 250 μ m x 0.25 μ m) y se usó helio como gas acarreador a una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. El programa del horno GC comenzó a una temperatura inicial de 45 °C, se mantuvo por 5 minutos y luego se incrementó a una velocidad de 10 °C por minuto hasta obtener una temperatura final de 300 °C, la cual se mantuvo durante 25 minutos. La temperatura de la línea de transferencia se ajustó a 250 °C. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV de energía electrónica. Las mediciones se realizaron en modo scan con un rango de m/z establecido en 40-550. La fuente de iones y la temperatura del analizador cuadrupolo fueron 230 °C y 150 °C respectivamente, se mantuvieron funcionando a 2.9 exploraciones por segundo.

Los datos obtenidos por el GC-MS se examinaron con el software MassHunter Workstation versión B.06.00 (Agilent Technologies). El software AMDIS (<http://www.amdis.net/>) se utilizó para la determinación del tiempo de retención y la extracción del espectro de masas de cada componente de los cromatogramas. Se utilizó el software de la biblioteca de espectros de masas y la base de datos NIST MS para la identificación de compuestos.

3.8 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (bacterias)

3.8.1 Microorganismos utilizados

Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizaron cinco bacterias Gram positivas *Staphylococcus epidermidis* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC, *S. aureus* Ox^R, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* sp. y cinco bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Chromobacterium violaceum* CV026. Los microorganismos se sembraron en medios diferenciales y se les realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para comprobar su autenticidad de acuerdo al Manual de Bergeys de Bacteriología Sistemática (Garrity et al., 2005).

3.8.1.1 Preparación del inóculo bacteriano

Las bacterias se aislaron en medios selectivos y diferenciales hasta obtener colonias puras. Las colonias seleccionadas se sembraron en 2 mL de Caldo Müeller-Hinton y se incubaron 18 h a 37 °C hasta la fase de logarítmica. El cultivo se diluyó en solución salina fisiológica hasta obtener una absorbancia de 0.1 a 600 nm equivalente al estándar 0.5 de McFarland con carga microbiana a 1×10^8 UFC/mL.

3.8.1.2 Prueba de difusión en disco

Se colocaron 10 y 30 µg de Extracto Etanólico, fracciones orgánicas y F8 en discos estériles de papel filtro. Posteriormente los discos se colocaron sobre un césped bacteriano inoculado en placas de Agar Müeller-Hinton (MH), se dejaron reposar a 4 °C durante una hora y posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición generado por los extractos evaluados. Se realizaron tres réplicas por tratamiento, y los experimentos se repitieron tres veces (ver diagrama de proceso en (Figura 6)).

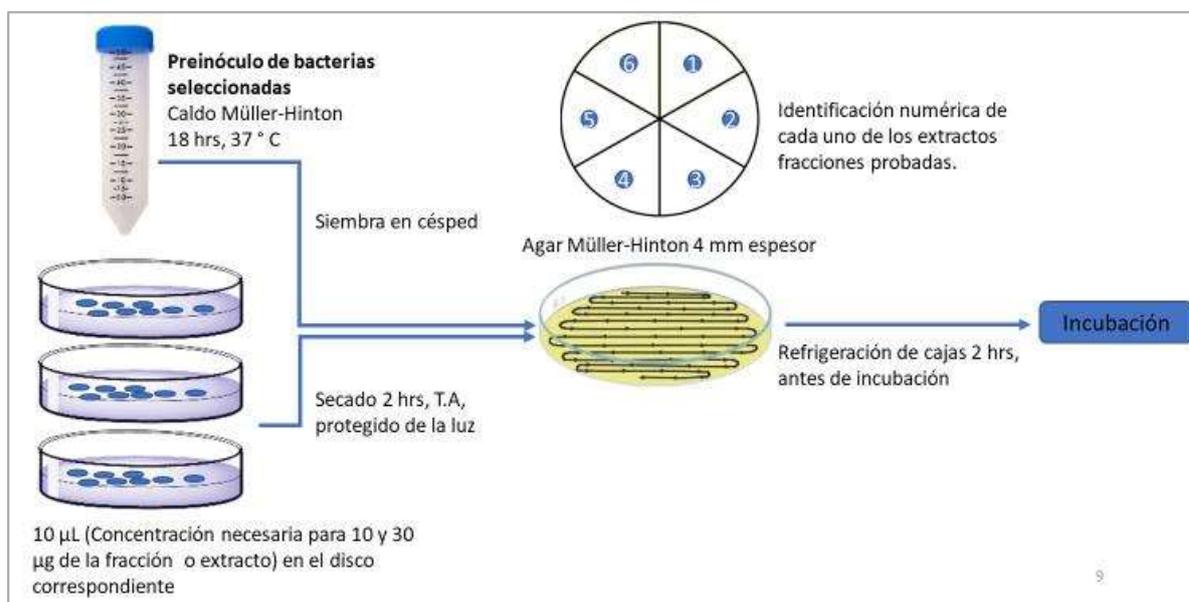


Figura 6. Diagrama de prueba de difusión en disco.

3.8.1.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se utilizó el protocolo M100 propuesto por el CLSI (Coyle, 2005) y los lineamientos establecidos por Cos y colaboradores (2006) y Balouiri (2016). Se empleó el método de microdilución en placa, para ello, la solución del compuesto a evaluar se diluyó 1:2 en caldo Müeller-Hinton. Los pozos se inocularon con una suspensión bacteriana a turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland para tener 1×10^8 UFC/mL en cada pozo de la microplaca (Cos et al., 2006; Balouiri et al., 2016). La placa se incubó a 37 °C durante 24 h y posteriormente se inspeccionó de manera visual. La dilución más baja del compuesto donde no se observó desarrollo microbiano se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para comprobar la CMI, a cada pozo se le agregaron 5 µl de una solución indicadora de cloruro de tetrazolio al 0.05 %. Los pozos donde no se observó la reducción del cloruro de tetrazolio indicaron ausencia de actividad microbiana.

3.8.1.4 Actividad anti Quorum sensing

C. violaceum CV026 se inoculó en caldo LB suplementado con Kanamicina (100 µg/mL) y se incubó a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, 500 µl del cultivo se mezclaron con 100 ml de agar LB fundido a 45 °C suplementado con Kanamicina (100 µg/mL) y 1 µM de *N*-butanoil-l-homoserine lactone (C4-HSL). La mezcla se vertió en cajas de Petri y se agitó suavemente para una distribución uniforme. Para la actividad anti quorum sensing, se colocaron discos sobre la superficie del agar impregnados con Extracto Etanólico y fracciones orgánicas. La ausencia de pigmentación morada en las colonias de *C. violaceum* CV026 indica actividad anti quorum. La aparición de colonias con pigmento morado indica que los extractos y fracciones carecen de actividad (ver Figura 7).

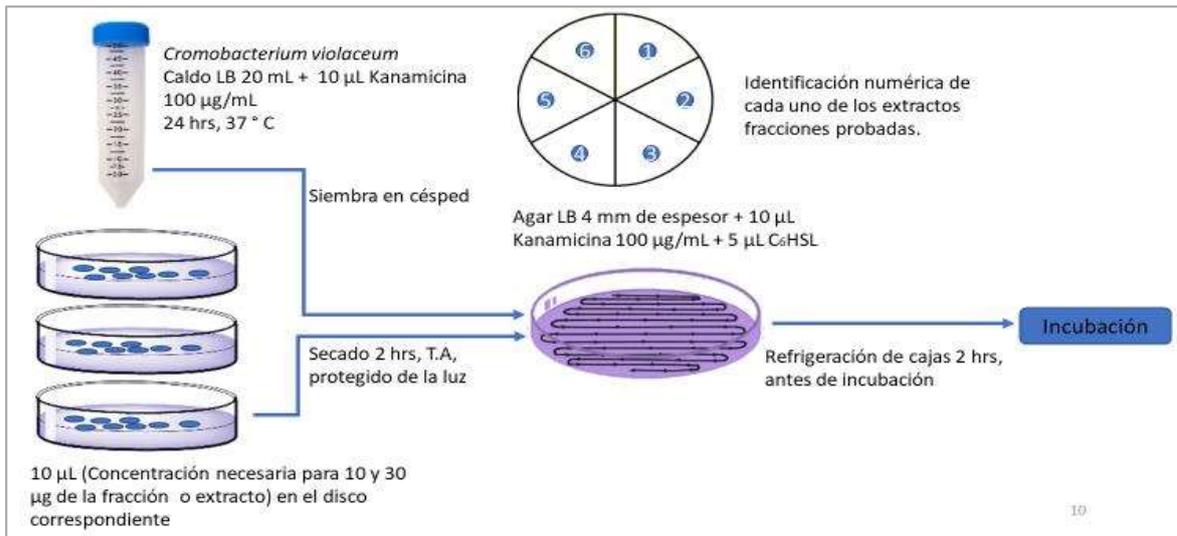


Figura 7. Diagrama de prueba de difusión en disco para medir el efecto contra Quorum Sensing de CV026

3.9 Actividad antiparasitaria contra *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

Los trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 que contiene 10 % de suero bovino suplementado con penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), 10 % de suero bovino adulto inactivado por calor y peptona Biosato®. Los trofozoítos se cosecharon en la fase de crecimiento logarítmico (48-72 h) mediante centrifugación en frío a 300 g durante 15 minutos. Posteriormente, los trofozoítos se lavaron en medio TYI-S-33, se cuantificaron en cámara de Neubauer y se resuspendieron en el medio de cultivo. Para la actividad antiparasitaria, los trofozoítos en medio TYI-S-33 se diluyeron hasta obtener suspensiones con 100,000 trofozoítos. Se evaluaron dosis fijas de 150, 300 y 500 µM de los compuestos, los tubos de cultivo se incubaron a 37 °C durante 12 y 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, los trofozoítos se cosecharon mediante centrifugación en frío y se resuspendieron en 100 µl de una solución estéril de azul de metileno al 1 % y se realizó la cuantificación de los trofozoítos viables utilizando la cámara de Neubauer (Ortega-Pulido y col. 2019). Se utilizó metronidazol (Sigma M1547) y etanol absoluto, como controles positivo y negativo, respectivamente. Como blanco (control de cultivo) se utilizó un cultivo de trofozoítos en las mismas condiciones, sin adición de sustancias. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y los experimentos se repitieron tres veces.

3.10 Determinación de la toxicidad con *Artemia salina*

Se eclosionaron huevecillos de *A. salina* en agua de mar artificial, se incubaron a 28 °C durante 24 h, se colocaron bajo una lámpara de luz amarilla y se alimentaron con dieta para peces. Para evaluar la toxicidad, se colocaron 20 nauplios de *A. salina* en un recipiente de plástico y se adicionaron las dosis de extractos, fracción metanólica y F8, etc. Los ensayos se incubaron en las mismas condiciones y se determinó la mortalidad a las 24 h. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió tres veces (Rajabi et al., 2015)

3.11 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos se analizaron estadísticamente mediante el programa SigmaPlot 11.0 y Statistica 8, se corrió análisis para estadística descriptiva y análisis de correlación para determinar causa-efecto respecto a la respuesta concentración-inhibición de los extractos y fracciones de *C. pulverulentus* sobre bacterias de interés clínico y *Entamoeba histolytica*.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Elaboración del Extracto Etanólico de *C. pulverulentus*

A partir de 100 g de planta fresca se recuperaron 7.86 ± 0.77 g de planta molida seca que fue macerada en etanol para obtener el Extracto Etanólico. Se obtuvieron 0.39 ± 0.01 g de Extracto Etanólico seco que corresponde al 5.10 ± 0.58 % de rendimiento con base a peso seco de la planta. El extracto fue analizado mediante GC-MS y se detectaron 94 picos, 74 picos (79 %) fueron identificados en la base de datos NIST, mientras que 20 picos (21 %) no mostraron similitud con compuestos reportados.

La mayoría de los compuestos identificados en el extracto corresponden a carbohidratos, ácidos orgánicos y esteroides. El compuesto más abundante en el Extracto Etanólico de *C. pulverulentus* fue la D-psicofuranosa con un tiempo de retención (RT) de 26.46 minutos y abundancia relativa de 9.74 % (Tabla 3), mientras que, entre los ácidos orgánicos, el ácido p-hidroxi-cinámico con TR de 27.41 fue el más abundante con una abundancia relativa de 6.79 %. Este compuesto ha sido previamente reportado en Extracto Etanólico de *C. pulverulentus* en un 7.38 % (Alonso-Castro et al. 2016). El ácido hidroxicinámico es un compuesto fenólico que actúa como antioxidante e inhibidor de la acción de los radicales libres (Mura-Mardones 2016). Se encuentra en una gran variedad de vegetales, frutas y granos; y presenta actividad antioxidante, antimicrobiana, e inmunomoduladora.

Además, en el análisis de los compuestos del Extracto Etanólico de *C. pulverulentus* se identificó el estigmasterol con TR de 46.33 y el sitosterol con TR de 48.16, a los cuales se les ha atribuido actividad antiinflamatoria (Paniagua Pérez 2017, Liu 2019). En estudios previos, el estigmasterol y el sitosterol han sido identificados en un Extracto Etanólico de *C. pulverulentus* y podrían ser los responsables de la actividad antiinflamatoria atribuida a esta especie (Alonso-Castro et al., 2016).

Tabla 3. Perfil cromatográfico del Extracto Etanólico de *Costus pulverulentus*. Donde T.R representa tiempo de retención y AR% = Área relativa.

T.R	Área	AR %	Compuesto
16.22	64415041	0.43%	Ácido 2 propanoico

16.39	86502205	0.58%	Ácido acético
17.03	5839568	0.04%	Ácido 4-oxo-pentanoic
17.11	77117756	0.52%	Ácido etanedioico
17.51	94730406	0.63%	Ácido 3 propanoico
17.81	3733402	0.03%	Ácido 4 utanoico
18.04	5246210	0.04%	Pantoil lactona
18.86	86406085	0.58%	Etil-succinato
19.00	3848180	0.03%	Ácido benzoico
19.65	203469984	1.36%	Glicerol
19.95	298915883	2.00%	Ácido butanodioico
20.39	281682650	1.89%	Ácido 2,3 propanoico
20.45	85973065	0.58%	Ácido Buten 2 oico
20.79	55508738	0.37%	Benzaldehído 4 hidroxí
21.54	48104470	0.32%	
22.28	177791677	1.19%	
22.44	937122723	6.28%	
22.90	23019405	0.15%	Meso-eritrol
23.28	33708435	0.23%	L-ácido treonico
23.43	17557744	0.12%	L-ácido treonico
23.75	566648797	3.80%	D-ribofuranosa
23.85	11953133	0.08%	
23.92	26425632	0.18%	D-ácido arabinonico
23.96	48072614	0.32%	DL-arabinopiranososa
24.00	52761475	0.35%	Beta-D-alopiranososa
24.21	49618016	0.33%	Arabinosa
24.31	823516190	5.52%	D-ribofuranosa
24.45	27888681	0.19%	Alcohol isotridecílico
24.48	47216134	0.32%	Ácido 2,3,4,5 tetrahidroxipentanoico 1,4 lactona
24.55	95231516	0.64%	D-Arabinopiranososa
24.58	48302537	0.32%	Ácido 3,4,5 trihidroxipentanoico

24.78	32449092	0.22%	D-ácido ribonico, gamma lactona
25.43	74168689	0.50%	D-ácido xilonico, gamma lactona
25.52	226473829	1.52%	Ácido 4 benzoico 3 metoxi
26.33	18984813	0.13%	D-ácido xilonico, delta lactona
26.46	1412862450	9.47%	D-psicofuranosa
26.52	1090511919	7.31%	L-sorbofuranosa
26.65	235873054	1.58%	D-Psicofuranosa
26.68	227010170	1.52%	D-psicofuranosa
26.71	429464185	2.88%	D-fructofuranosa
26.81	147121274	0.99%	D-fructofuranosa
26.91	168671068	1.13%	D-fructofuranosa
27.02	405260453	2.72%	D-fructofuranosa
27.11	352125763	2.36%	D-fructopiranososa
27.27	126271722	0.85%	
27.33	425734626	2.85%	Glucopiranososa
27.41	1013804119	6.79%	p-hidroxi-ácido cinámico
27.53	69029718	0.46%	Beta-D-alopiranososa
27.60	53442168	0.36%	
27.74	32562183	0.22%	Alfa-D-talopiranososa
27.79	44249977	0.30%	Ácido hexadecanoico
27.85	17299738	0.12%	
27.90	126838987	0.85%	
27.96	78560960	0.53%	D-Manitol
28.05	384015073	2.57%	Beta-D-glucopiranososa
28.37	242489495	1.63%	Ácido hexadecanoico
28.74	53969827	0.36%	
29.34	50007094	0.34%	
29.42	82758858	0.55%	Myo-inositol
29.86	363019859	2.43%	9,12,ácido octadecadienoico
29.91	83015322	0.56%	Alfa-ácido linolenico

30.13	201992686	1.35%	Ácido octadecanoico
30.63	20278652	0.14%	Uridina
30.92	39069021	0.26%	
31.10	18435572	0.12%	
31.15	63480975	0.43%	Gliceril glucosido
31.24	21465730	0.14%	Ácido tetracosanoico
31.48	26344997	0.18%	
31.52	39520735	0.26%	
31.58	27451138	0.18%	D-Ribosa
31.70	45945158	0.31%	Uridina
31.81	24026414	0.16%	
31.86	21663192	0.15%	D-ribofuranosa
32.03	37960612	0.25%	D-arabinosa
32.07	73058917	0.49%	Uridina
32.30	40860383	0.27%	4-Chlro-N-(4-chloro-2-phenoxyphenyl)benzenesulfonamide tms
32.47	27811064	0.19%	
32.89	42565399	0.29%	
32.97	22231107	0.15%	DL-Arabinose-benziloxima
33.09	54936020	0.37%	Beta-D-glucopiranososa
33.26	40090080	0.27%	Hexadecanoic acid
33.48	36293190	0.24%	D-galactosa
33.63	92611805	0.62%	D-xilosa
33.90	33303763	0.22%	
33.95	29980331	0.20%	
34.38	37447783	0.25%	
34.57	447410473	3.00%	D-Psiosa-benziloxima
34.87	665048611	4.46%	Arabiitol
35.25	27777591	0.19%	Ribopiranososa
35.75	56067709	0.38%	Sacarosa

42.65	14434125	0.10%	Colesterol
45.44	28074684	0.19%	Ergosterol
46.33	81606584	0.55%	Estigmasterol
48.16	26170230	0.18%	Sitosterol
	14921789568	100.00%	

4.2 Determinación de la actividad antimicrobiana del Extracto Etanólico (E.E.) de *Costus pulverulentus*

C. pulverulentus es utilizada en la medicina tradicional para tratamiento del “mal de orín”, una enfermedad con sintomatología que sugiere una infección en las vías urinarias (IVU). Las IVUs son causadas por enterobacterias, siendo las más frecuentes *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* que colonizan el tracto urinario causando variedad de síntomas compatibles con el “mal de orín”. Además de las enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *Enterococcus faecalis*, también son agentes etiológicos de IVUs.

Para determinar el efecto antimicrobiano de *C. pulverulentus* se evaluó el E.E. contra cinco bacterias, 3 Gram negativas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, relacionadas con el mal de orín; y *Aeromonas hydrophila* que también se ha reportado como agente etiológico en la orina de pacientes con cistitis y bacteriuria asintomática (Tena et al. 2007). También se evaluó contra 2 Gram positivas *Enterococcus faecalis* y *Bacillus* sp.

Para la evaluación se impregnaron discos de papel filtro con 10 µg del E.E. y se colocaron sobre un césped de bacterias inoculadas en el agar MH (Figura 8). Los resultados muestran que el E.E. de *C. pulverulentus* forma un halo de inhibición de crecimiento en las placas donde se inocularon las dos bacterias Gram positivas, *E. faecalis* y *Bacillus* sp., respectivamente (Figura 8: A, B). Los resultados muestran que el E.E. tiene actividad significativa contra *Bacillus* sp generando un halo de 16 ± 0.06 cm, este valor es cercano al valor establecido (20 mm), por la CLSI con el cual se indica que el microorganismo presenta sensibilidad intermedia al E.E. de *C. pulverulentus*. En lo que respecta al efecto contra *E. faecalis*, el E.E. genera un halo de 7 mm; sin embargo, este valor carece de significado clínico y se clasifica como resistencia de la bacteria al E.E. de *C. pulverulentus*. En lo que respecta

a las bacterias Gram negativas, no se observó inhibición del crecimiento en ninguna de las especies evaluadas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del efecto del E.E. contra las bacterias evaluadas

Microorganismo	Halo de inhibición (mm)	
	E.E.	Control Kanamicina (Km)
<i>Escherichia coli</i>	0	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	20
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	7 ± 0	15
<i>Bacillus sp.</i>	16 ± 0.06	19

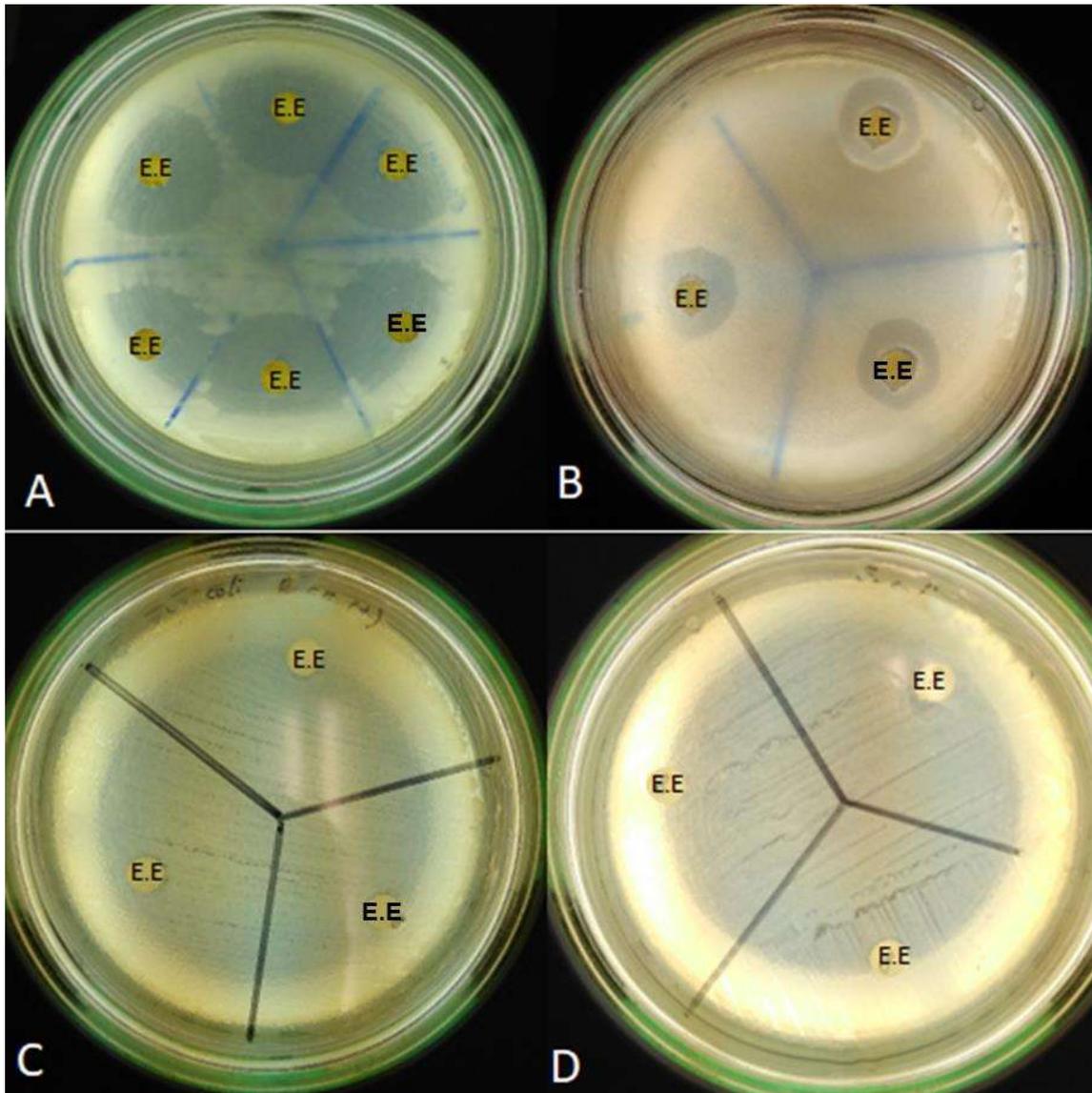


Figura 8. Efecto del E.E. de *C. pulverulentus* contra A) *Bacillus* sp., B) *E. faecalis*, C) *E. coli*, D) *K. pneumoniae*.

4.3 Determinación de la Actividad anti-Quorum Sensing del E.E. de *Costus pulverulentus*

El quórum sensing (QS) es el sistema de comunicación en la mayoría de las especies bacterianas, regula a nivel transcripcional la expresión de genes involucrados en patogenicidad y virulencia (Oliveiro et al., 2011). En bacterias Gram negativas, el QS está mediado por moléculas inductoras denominadas acil-homoserin lactonas (AHL) que son producidas en respuesta a densidad poblacional y son específicas para cada especie de microorganismo (Oliveiro et al., 2011). En la actualidad el QS es considerado uno de los

blancos terapéuticos para controlar las infecciones causadas por las bacterias Gram negativas (Oliveiro et al., 2011). Por esta razón, se realiza la búsqueda de compuestos inhibidores del QS en extractos, aceites esenciales y compuestos puros.

El modelo más utilizado es *Chromobacterium violaceum* CV026 que produce un pigmento denominado violaceína. En este trabajo se evaluó el efecto del E.E. para determinar si posee metabolitos capaces de bloquear el mecanismo de QS en *C. violaceum* CV026 mediante la inhibición de la síntesis de violaceína. Los resultados obtenidos muestran que la producción de violaceína no se afecta en presencia del E.E., indicando que el extracto de *C. pulverulentus* no posee compuestos anti-QS. Sin embargo, el E.E. posee efecto inhibidor de crecimiento a una dosis de 10 µg/disco generando un halo de inhibición de 12 mm en la placa inoculada con *C. violaceum* CV026 (Figura 9).

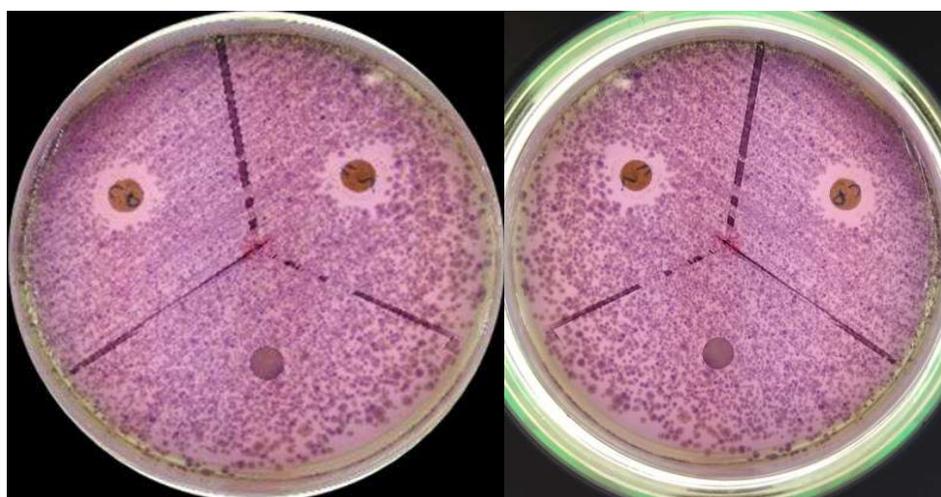


Figura 9. Efecto del E.E. contra *C. violaceum* CV026. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

4.4 Fraccionamiento del Extracto Etanólico de *C. pulverulentus*

Una vez demostrado el efecto inhibidor del E.E. contra *Bacillus* sp., *E. faecalis* y *C. violaceum* CV026, se procedió a fraccionar el extracto crudo de *C. pulverulentus*, a fin de aislar y/o purificar el metabolito con actividad inhibitoria. Para aislar los compuestos presentes en el E.E. de *C. pulverulentus*, el extracto se llevó a sequedad total y el residuo seco se fraccionó con solventes de polaridad creciente. Se obtuvieron 6 fracciones en las cuales se realizó la partición de los compuestos presentes en el E.E. Los compuestos del E.E. se distribuyeron en cada fracción de acuerdo a la polaridad del solvente utilizado (Figura 10).

De acuerdo a la composición del E.E., las ceras y los pigmentos verdes tuvieron afinidad por el hexano. El resto de los componentes presentó color que va del amarillo al café. En todas las repeticiones del proceso se obtuvo el mismo patrón de color (Figura10).

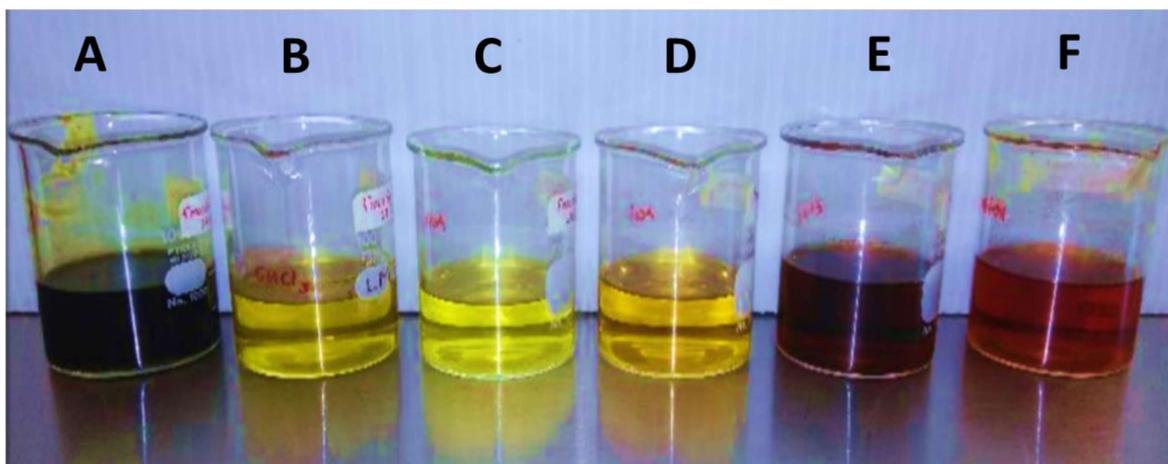


Figura 10. Fracciones orgánicas del Extracto Etanólico de *C. pulverulentus*. A) Hexano, B) Cloroformo, C) Acetato de Etilo, D) Acetona, E) Etanol, F) Metanol.

Las fracciones orgánicas fueron concentradas a sequedad para obtener el residuo, se pesaron y se determinó el rendimiento (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento de las fracciones orgánicas obtenidas a partir del E.E*.

Fracción	Peso	Rendimiento %
Hexánica	0.4651 g	0.4651 %
Clorofórmica	0.0180 g	0.0180 %
AceOEt	0.0090 g	0.0090 %
Acetona	0.0128 g	0.0128 %
Etanólica	0.1294 g	0.1294 %
Metanólica	0.3054 g	0.3054 %

* Rendimiento basado en 100 g de peso seco de la planta.

4.5 Actividad antimicrobiana de las fracciones orgánicas obtenidas a partir del E.E.

Para determinar el efecto de las fracciones orgánicas se utilizaron 30 µg por disco para hacer la comparación con el efecto del antibiótico de referencia (Kanamicina). Se evaluó contra las bacterias del primer escrutinio para identificar si las fracciones tienen efecto.

Los resultados obtenidos muestran que las fracciones hexánica, clorofórmica, AceOEt y acetónica son inactivas contra las bacterias evaluadas. Sin embargo, las fracciones etanólica

y metanólica generan un halo de inhibición, dependiente de la concentración. En el caso de *Bacillus* sp. la fracción etanólica genera un halo de 8 ± 0 mm, mientras que la fracción metanólica 15 ± 0.5 mm, indicando que el compuesto bioactivo del E.E. se encuentra en la última fracción. En *E. faecalis*, se obtiene un halo de inhibición similar al generado por el E.E. completo, que de acuerdo a la CLSI indica que la bacteria posee resistencia al extracto (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto antimicrobiano de las fracciones de *Costus pulverulentus* a $30\mu\text{g}/\text{disco}$ (Concentración establecida para discos de kanamicina, que es el antibiótico de referencia)

Bacteria	Fracción / Inhibición (mm)						Control
	Hex	CH ₃ Cl	AceOEt	Acetona	EtOH	MeOH	
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	7	6	15
<i>Bacillus</i> sp.	0	0	0	0	8	15 ± 0.5	19
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	0	0	0	0	0	12	0
Control (Kanamicina)	Inhibición dependiente de la bacteria según estándares internacionales (BSAC, 2013).						

En el caso de *C. violaceum* CV026, la fracción metanólica genera halo de inhibición de 12 ± 0 mm, con una sensibilidad intermedia a la fracción metanólica. Estos resultados muestran que las fracciones polares (etanólica y metanólica) inhiben de manera diferencial, el desarrollo de *E. faecalis*, *Bacillus* sp. y *C. violaceum* CV026, sugiriendo que los compuestos responsables del efecto antimicrobiano son de naturaleza polar (Figura 11). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el ensayo completo se reprodujo tres veces obteniendo resultados similares.

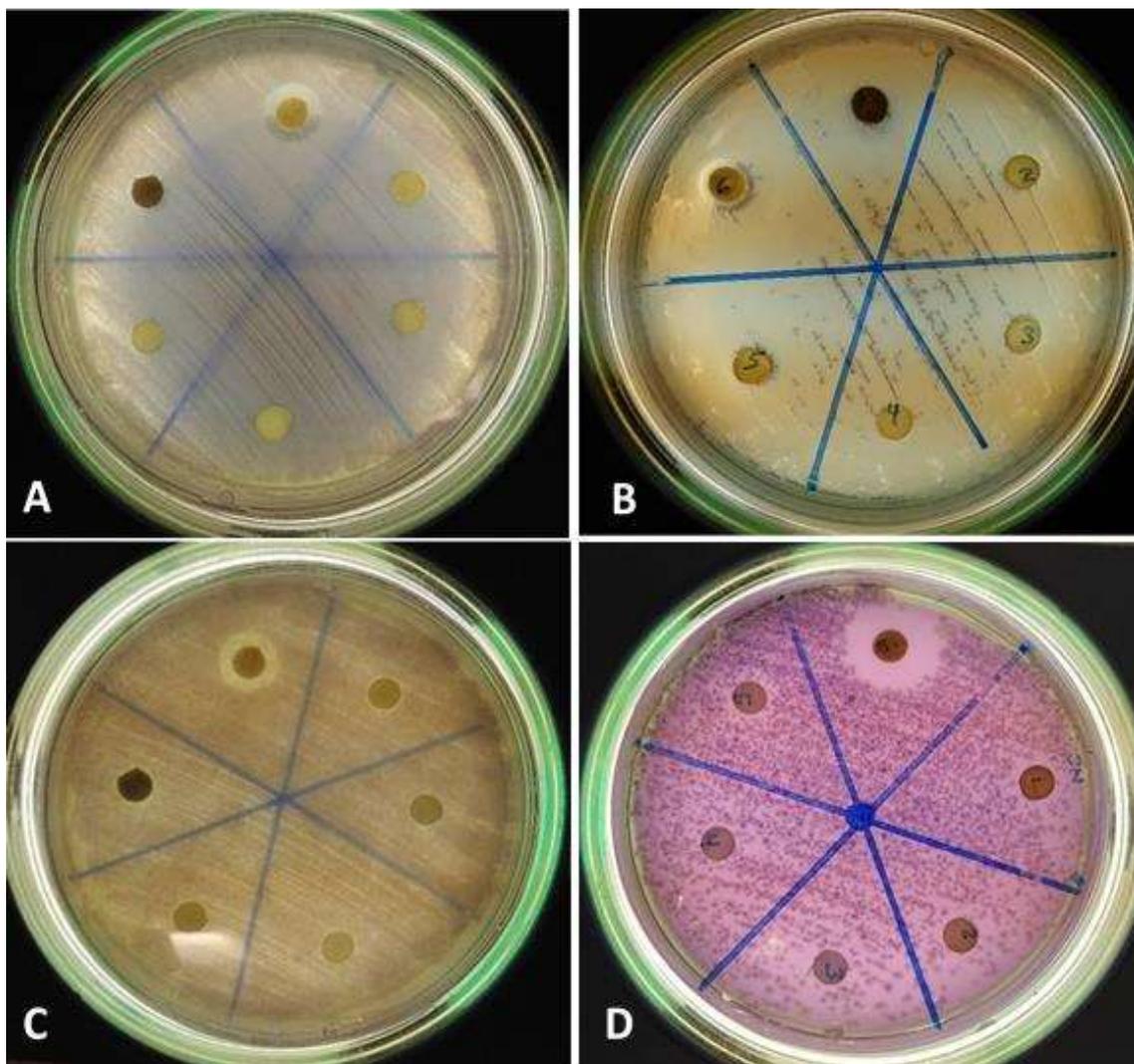


Figura 11. Efecto de las fracciones 1-6 en el desarrollo de A) *Bacillus* sp. B) *Enterococcus faecalis* C) *C. violaceum* CV026 d) *C. violaceum* CV026. *Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

4.6 Cromatografía en Columna abierta de la Fracción metanólica

Una vez identificada la fracción bioactiva se procedió a la separación mediante cromatografía en columna abierta. Se utilizaron 200 mg de la fracción metanólica y se eluyeron con un gradiente de polaridad con el sistema de solventes Hexano: AceOEt: MeOH. Se obtuvieron 32 (Figura12) fracciones y se llevaron a sequedad en el Rotavapor R-100, las fracciones se resuspendieron en metanol y se analizaron mediante TLC. El proceso se repitió 10 veces obteniendo el mismo patrón de color y bandas, mediante TLC. Las fracciones que mostraron el mismo patrón de bandas se reunieron en un solo vial.



Figura 12. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna abierta a partir de la fracción metanólica.

4.7 Actividad antimicrobiana de las Fracciones (F1-F32)

Para determinar la actividad antimicrobiana de las 32 fracciones, se colocaron 10 µg de fracción por disco y se evaluaron contra los microorganismos que previamente mostraron mayor sensibilidad a la fracción metanólica, *Bacillus* sp. y *C. violaceum* CV026 (Figura13).

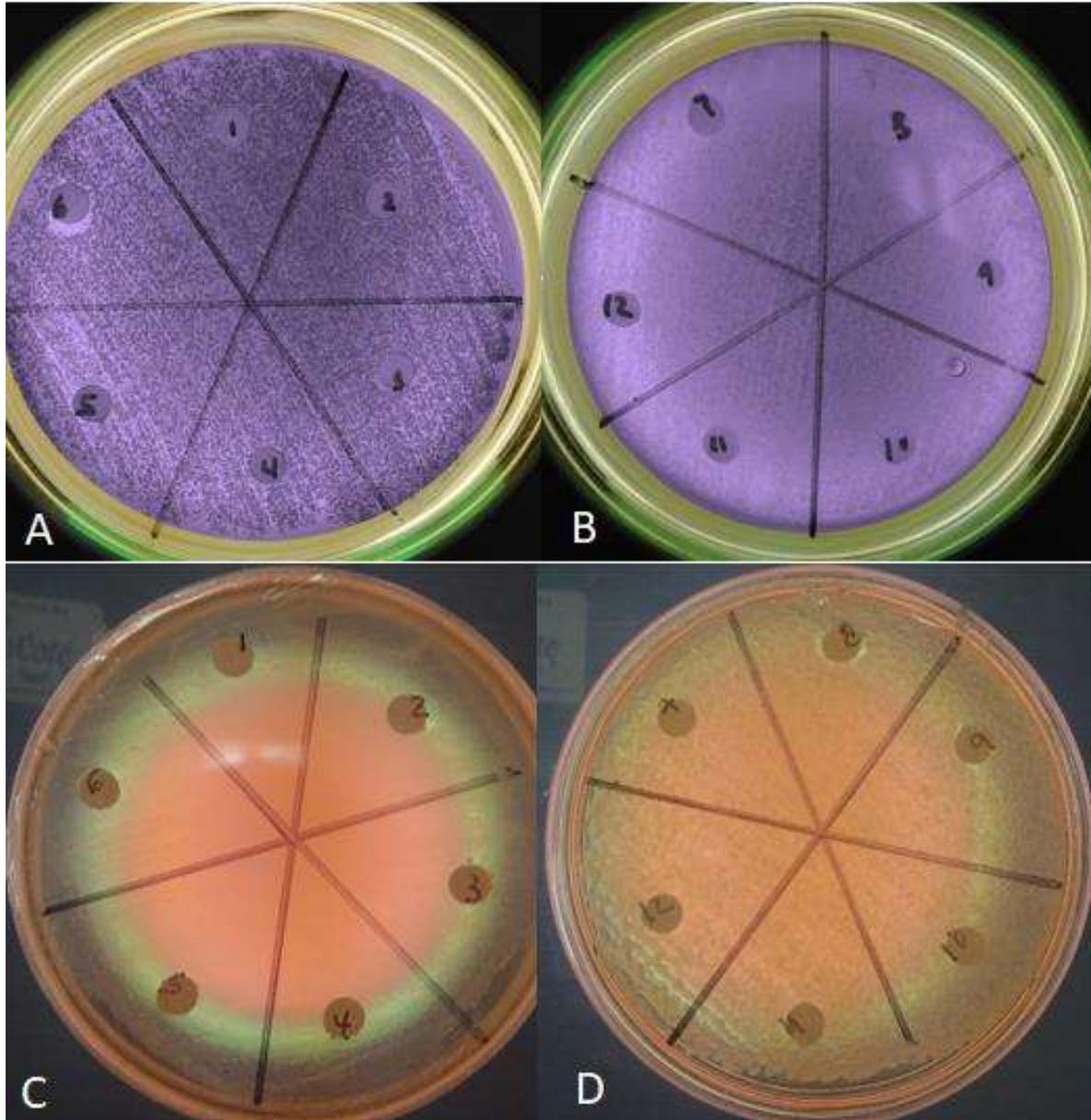


Figura 13. Efecto de las fracciones 1-12 en el desarrollo de A) *C. violaceum* CV026 fracción 1-6 (10 µg/disco), B) *C. violaceum* CV026 fracción 7-12 (10 µg/disco), C) *Bacillus* sp. fracción 1-6 (10 µg/disco) D) *Bacillus* sp. fracción 7-12 (10 µg/disco) inhibición 8 ± 0 mm.

Los resultados obtenidos muestran que, la Fracción 8 (F8) genera un halo de inhibición de 18 ± 0 mm en el cultivo de *Bacillus* sp., indicando que la F8 posee él o los metabolitos responsables del efecto inhibitorio generado por la fracción metanólica. El resto de las fracciones no mostraron efecto inhibitorio a la dosis evaluada.

Por otra parte, se observó que ninguna de las fracciones inhibe el desarrollo de *C. violaceum* CV026, lo cual indica que el efecto antimicrobiano se pierde al realizar la partición de la fracción metanólica. Este resultado sugiere que, para esta bacteria, el efecto de la fracción metanólica podría deberse a la acción sinérgica de los compuestos presentes (Figura14).

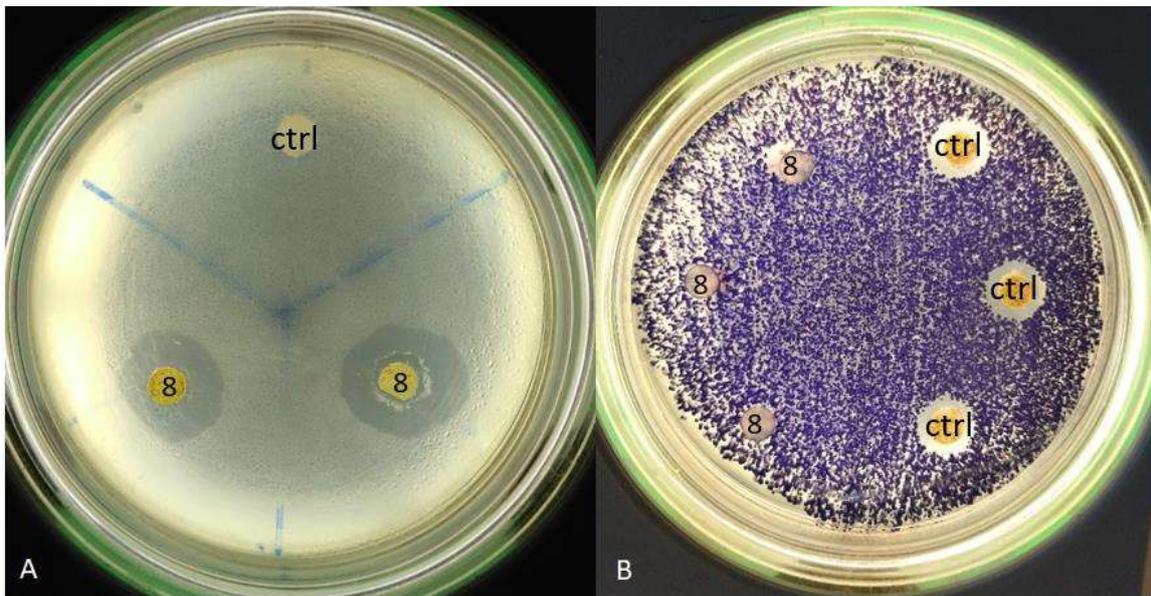


Figura 14. Efecto de la F8 en el desarrollo de A) *Bacillus* sp. y B) *C. violaceum* CV026 inhibición 8 ± 0 mm.

4.8 Actividad antimicrobiana contra microorganismos de importancia clínica

Una vez obtenida la F8 se realizaron ensayos de inhibición contra bacterias de importancia prioritaria de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud. Para ello se utilizaron los lineamientos establecidos por la CLSI (Cos, Vlietinck, Berghe, y Maes, 2006; Balouiri, Sadiki, y Ibnsouda, 2016). Se utilizaron 30 μg de F8 por disco y se evaluaron contra las bacterias representativas de cada grupo microbiano (Tabla 7). Los resultados obtenidos muestran que la F8 inhibe el desarrollo de *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* Ox^R y carece de efecto contra las bacterias Gram negativas evaluadas (Figura 15). Para el caso de *S. aureus* ATCC 29213 se obtuvo un halo de 18 mm, el cual de acuerdo a los criterios de CLSI indica sensibilidad a la F8. En lo que respecta a *S. aureus* Ox^R la F8 genera un halo de 18 mm de diámetro; sin embargo, existe desarrollo de colonias dentro del halo sugiriendo que la cepa tiene susceptibilidad heterogénea. Resultados similares fueron obtenidos con el antibiótico utilizado como referencia (Km). En el caso de las enterobacterias y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, la F8 no ejerce efecto inhibitorio.

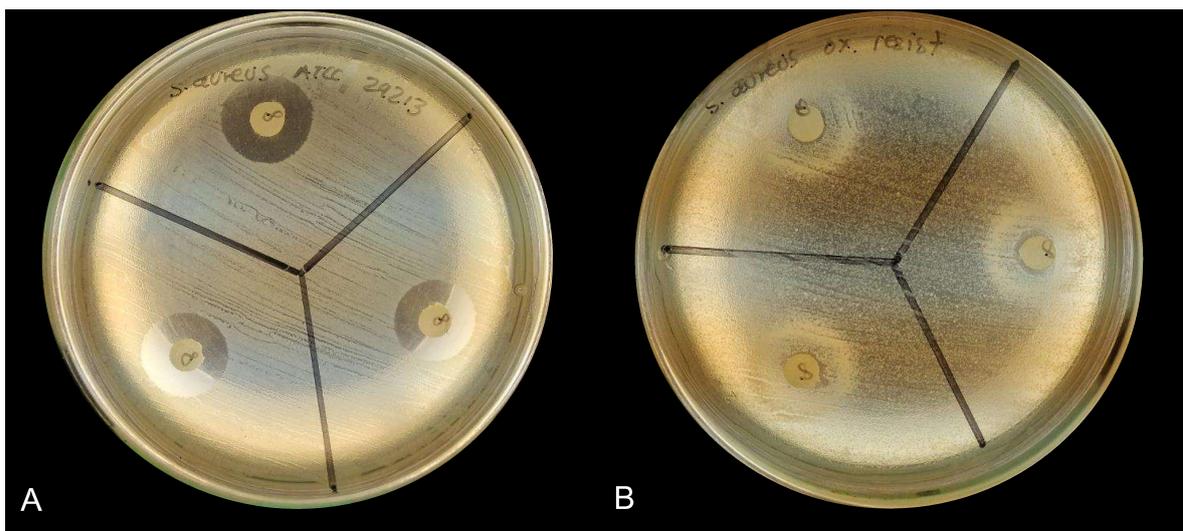


Figura 15. Efecto inhibitorio de la fracción 8 contra: A) *S. aureus* ATCC 29213 y B) *S. aureus* oxacilina resistente (susceptibilidad heterogénea).

En lo que respecta al efecto contra bacterias Gram negativas, no se observó efecto significativo.

Tabla 7. Bacterias representativas por grupo de microorganismos evaluadas contra la fracción 8 (F8) de *C. pulverulentus*

Grupo	Bacteria representativa	Halo (mm)	
		F8 mm	Km*
Cocos Gram-positivo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	18	19
	<i>Staphylococcus aureus</i> Ox ^R	18 (Het)	19
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	25
Enterobacteria encapsulada No	<i>Escherichia coli</i> ATCC 15597	0	20
	<i>Escherichia coli</i> BLEE +	0	20
	<i>Escherichia coli</i> BLEE -	0	20
Enterobacteria encapsulada	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 22895	0	20
No enterobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 30298	0	22

*El valor representa el diámetro mínimo requerido para considerar a un microorganismo sensible al fármaco control (Kanamicina) (BSAC, 2013).

4.9 Análisis y caracterización de la F8

La cristalización de la F8 mostró un sólido uniforme color verde oliva, lo cual sugería que se trataba de un compuesto puro. Para determinar la pureza de la F8 se realizó TLC utilizando cinco sistemas de solventes de distinta polaridad. El análisis bajo luz UV reveló que el mejor sistema de solventes fue Hex: AceOEt: MeOH (70:30:0.2), el cual resuelve cuatro bandas con RF 0.44, 0.47, 0.72, 0.85, sugiriendo la F8 contiene al menos 4 compuestos mayoritarios, los cuales podrían ser los responsables del efecto inhibitorio contra *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* Ox^R (heterogénea).

La F8 se analizó mediante GC-MS para determinar los compuestos responsables de la actividad inhibitoria. El análisis del cromatograma reveló la presencia de 16 picos, de los cuales 13 picos (81.25 %) corresponden a ácidos orgánicos, 2 (12.5 %) no fueron identificados en la biblioteca NIST y 1 (6.25 %) fue identificado como glicerol (Tabla 8).

Entre los compuestos más abundantes se encuentra el glicerol en un 38.33 % de abundancia relativa. Se ha demostrado que el glicerol a concentraciones de 50 y 80 % alteran la viabilidad de *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., dicho efecto depende de la concentración y del tiempo de exposición (Saegeman et al. 2008). Dentro de los ácidos orgánicos identificados, los más abundantes son el ácido p-cumárico en 24.65 % y el ácido vanílico en

20.24 %; éstos pertenecen al grupo de los polifenoles, y podrían ser los responsables del efecto antimicrobiano de la F8 contra *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* Ox^R (heterogénea). Además, se identificó un tercer polifenol, el ácido p-hidroxibenzoico, el cual podría ejercer efecto sinérgico con los ácidos mayoritarios en la F8.

Tabla 8. Perfil cromatográfico de la F8

T.R	Área	AR %	Compuesto
12.47	182229996	3.18	Ácido Láctico
12.89	49836550	0.87	Ácido hidroxiacético
18.86	2194509791	38.33	Glicerol
19.39	32683803	0.57	Ácido Maleico
19.64	344369982	6.02	Ácido Succínico
20.29	53985329	0.94	Ácido Glicérico
20.49	14528588	0.25	Ácido Fumárico
20.95	20439199	0.36	NI
22.93	72596375	1.27	Ácido 3,4-Dihidroxi butanoico
24.32	55911259	0.98	Ácido Málico
27.25	88872730	1.55	Ácido p-Hidroxi benzoico
30.38	1158551128	20.24	Ácido Vanílico
30.81	101690192	1.78	Ácido p-Cumárico isómero 1
30.99	16801180	0.29	Ácido Azelaico
32.45	29039520	0.51	NI
33.86	1309135295	22.87	Ácido p-Cumárico isómero 2

NI= Compuesto no indentificado en la base de datos.

4.10 Efecto antibacteriano del ácido p-cumárico y ácido vanílico

Para determinar el efecto de los compuestos mayoritarios de la F8, se obtuvo el ácido p-cumárico (Sigma C9008) y el ácido vanílico (Sigma 94770) de la casa comercial Sigma Aldrich y se evaluó la actividad antimicrobiana mediante microdilución en placa. Se detetminó la CMI del ácido p-cumárico y ácido vanílico contra *S. aureus* ATCC 29213 debido a que fue la bacteria más sensible a la F8. Para determinar el potencial de los compuestos puros, en el análisis se incluyeron las bacterias representativas de cada grupo de

acuerdo a la OMS, la enterobacteria no capsulada *E. coli*, la enterobacteria capsulada *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* que no pertenece a las enterobacterias. Además, se evaluó el efecto contra *S. epidermidis*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii*.

Los resultados obtenidos muestran que el ácido p-cumárico posee efecto antimicrobiano contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *K. pneumoniae* (Figura 16); mientras el ácido vanílico no muestra efecto inhibitorio a las concentraciones evaluadas (Tabla 9). Con el objetivo de determinar si la combinación de los ácidos podría potenciar la actividad antimicrobiana, se realizaron mezclas de ácido p-cumárico con ácido vanílico en proporción 1:0.88 (La relación está basada en los resultados obtenidos de la fracción 8 en la cromatografía de gases). Se evaluaron dosis similares a los compuestos individuales. Los resultados obtenidos mostraron que el patrón de inhibición no fue potenciado con la mezcla de los compuestos. Por el contrario, disminuyó el efecto en mezcla, debido a que la cantidad de ácido p-cumárico se redujo.

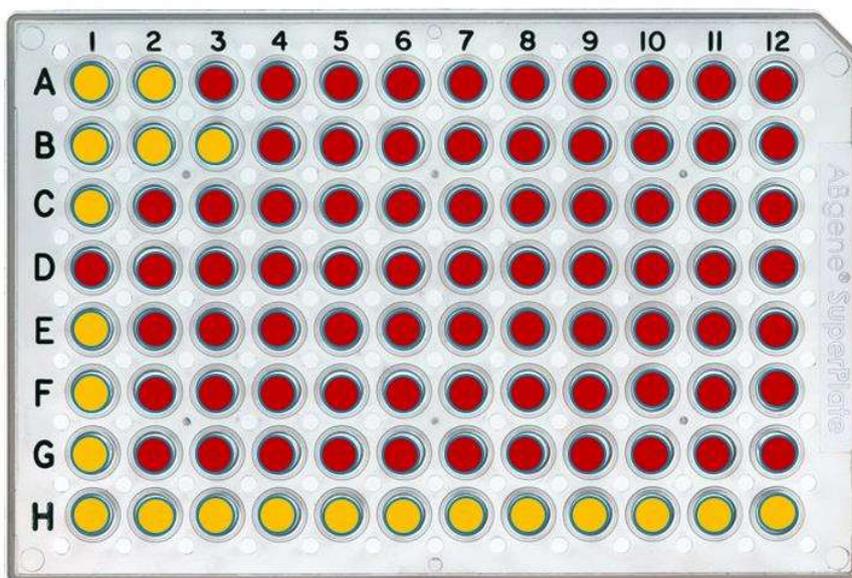


Figura 16. Las filas con medio MH se inocularon con A) *P. aeruginosa*, B) *S. aureus*, C) *E. coli*, D) *P. mirabilis*, E) *S. epidermidis*, F) *C. freundii*, G) *K. pneumoniae*, H) Control negativo, medio MH. En cada columna la concentración de ácido p-cumárico 1) 1000 µg/mL, 2) 500 µg/mL, 3) 250 µg/mL, 4) 125 µg/mL, 5) 62.5 µg/mL, 6) 31.25 µg/mL, 7) 15.62 µg/mL, 8) 7.82 µg/mL, 9) 3.90 µg/mL, 10) 1.95 µg/mL, 11) 0.97 µg/mL, 12) 0 µg/mL. El pozo en color rojo indica actividad bacteriana mediante la reducción del cloruro de tetrazolio.

Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria

Microorganismo	CMI µg/mL		
	Ácido p-cumárico	Ácido vanílico	Ácido p-cumárico/ Ácido vanílico
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 30298	500	> 1000	> 1000
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	250	> 1000	> 1000
<i>E. coli</i> ATCC 15597	1000	> 1000	> 1000
<i>P. mirabilis</i>	> 1000	> 1000	> 1000
<i>S. epidermidis</i>	1000	> 1000	> 1000
<i>C. freundii</i>	1000	> 1000	> 1000
<i>K. pneumoniae</i>	1000	> 1000	> 1000

4.11 Determinación de la actividad antiparasitaria contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

Estudios previos han demostrado que el extracto metanólico de las hojas de *Peucedanum longibracteolatum* posee efecto amebicida contra trofozoítos de *E. histolytica*. Los principales componentes de éste extracto son los ácidos *o*-cumárico, *p*-cumárico y vanílico y podrían ser los posibles responsables del efecto amebicida (Degerli y Tepe 2015). Sin embargo, el efecto de cada compuesto no ha sido determinado. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiamebiana del ácido *p*-cumárico y del ácido vanílico identificados en la F8.

4.12 Efecto del ácido p-cumárico en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

A las 12 h de incubación, ninguna de las concentraciones evaluadas de ácido p-cumárico ejerció efecto amebicida en los trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS ($p > 0.05$). Sin embargo, a las 24 h, se observó una disminución en el número de trofozoitos, 2 % a 150 µM (24 µg/mL), 14 % a 300 µM (49 µg/mL) y 32 % a 500 µM (82 µg/mL) con respecto al vehículo. Los resultados obtenidos muestran que, a las concentraciones evaluadas, el ácido p-cumárico ejerce efecto amebostático ($p < 0.05$) contra trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS (Figura 17 y 18).

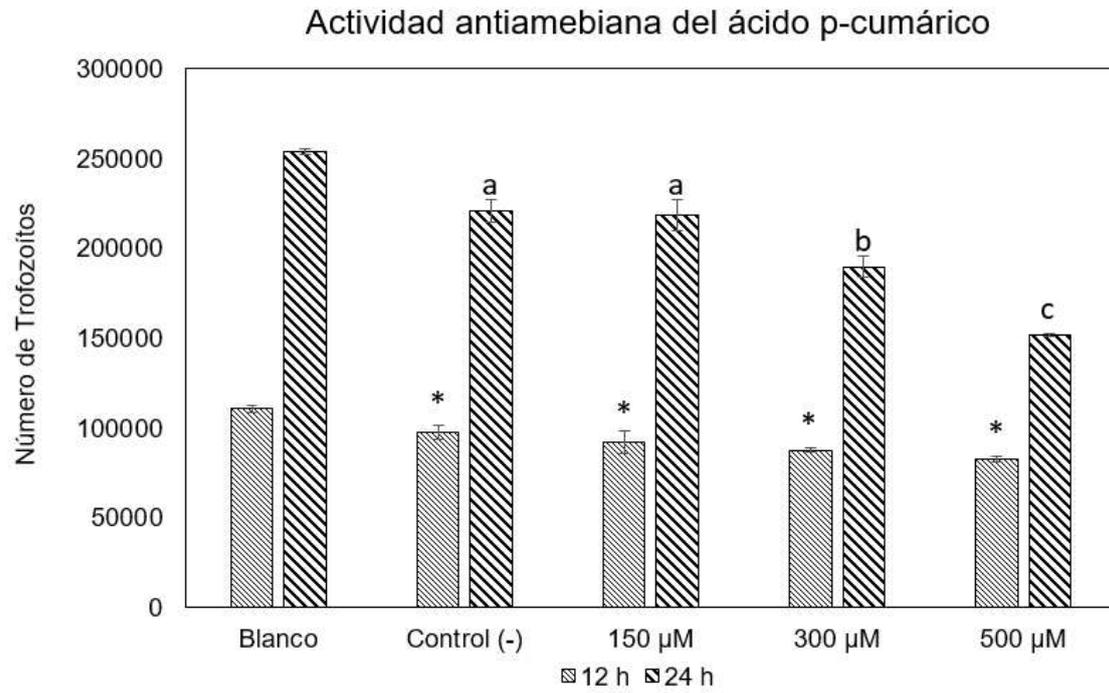


Figura 17. Efecto antiamebiano del ácido p-cumárico contra trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

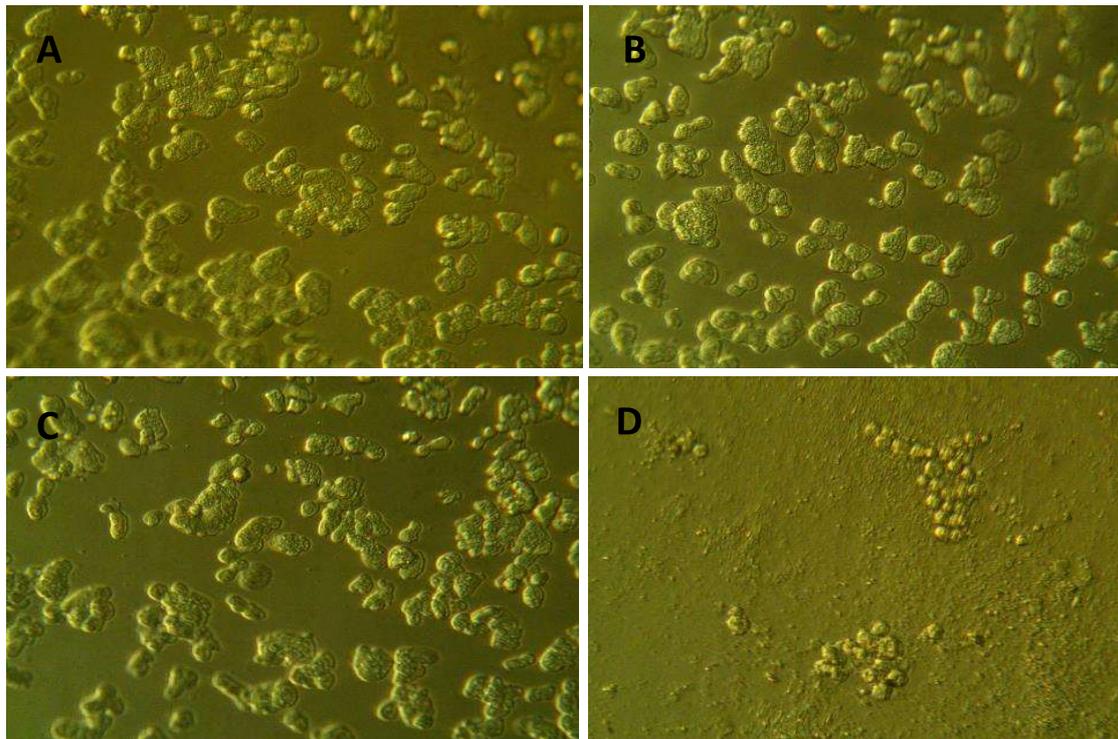


Figura 18. Efecto del ácido p-cumárico en trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS a las 24 h. A) Blanco, B) Control, C) 500 µM (82 µg/mL), D) Metronidazol.

4.13 Estimación de la dosis del ácido p-cumárico que inhibe el 50 % de los trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS.

Se realizó una curva de dosis-respuesta con los datos de inhibición del ácido p-cumárico en el cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* HM1-IMSS (Figura 19). La ecuación de la recta se utilizó para estimar la dosis del compuesto que inhibe el desarrollo del 50 % de la población (DI_{50}). Los resultados obtenidos, de acuerdo a la ecuación obtenida en la recta, muestran que la DI_{50} para el ácido p-cumárico es 712.64 μM (117 $\mu\text{g/mL}$), resultado superior a la DI_{50} reportada para el metronidazol (0.25 $\mu\text{g/mL}$), antiparasitario de referencia (Herrera-Martínez et al, 2016).

Curva dosis respuesta de ácido p-cumárico en trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS

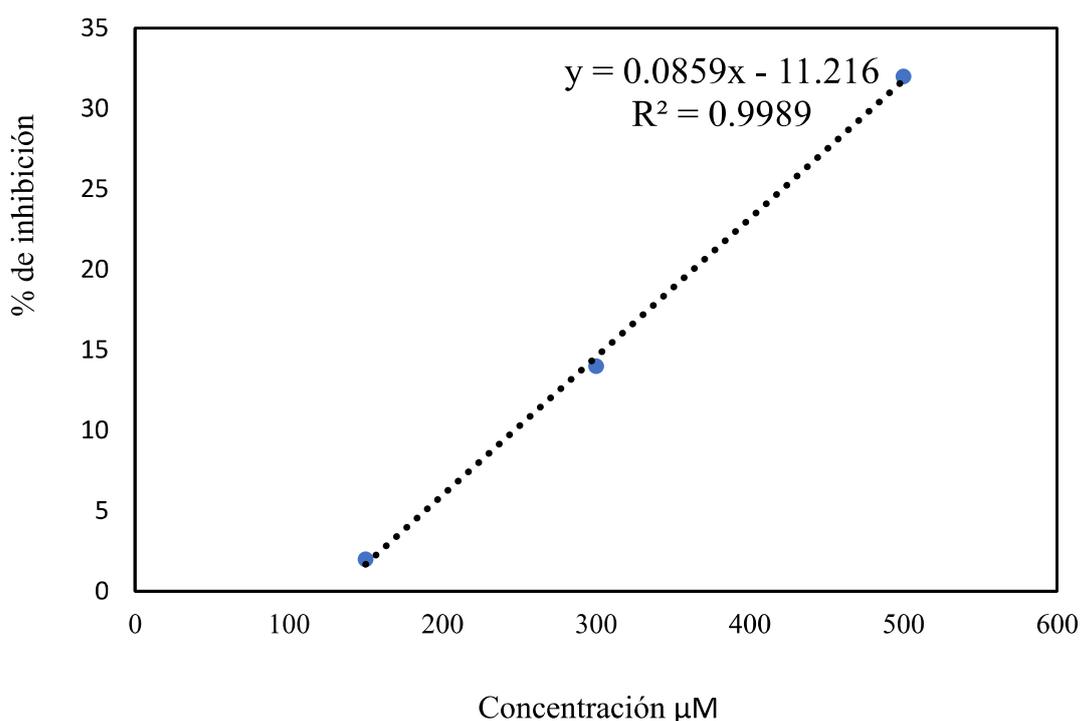


Figura 19. Curva de dosis-respuesta de ácido p-cumárico sobre trofozoítos de *E. histolytica*.

4.14 Efecto del ácido vanílico en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

En lo que respecta al ácido vanílico, a las dosis evaluadas 150 μM (25.2 $\mu\text{g/mL}$), 14 % a 300 μM (50.44 $\mu\text{g/mL}$) y 32 % a 500 μM (84 $\mu\text{g/mL}$), no se observó efecto antiamebiano en el cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS con respecto al control del vehículo (Figura 20).

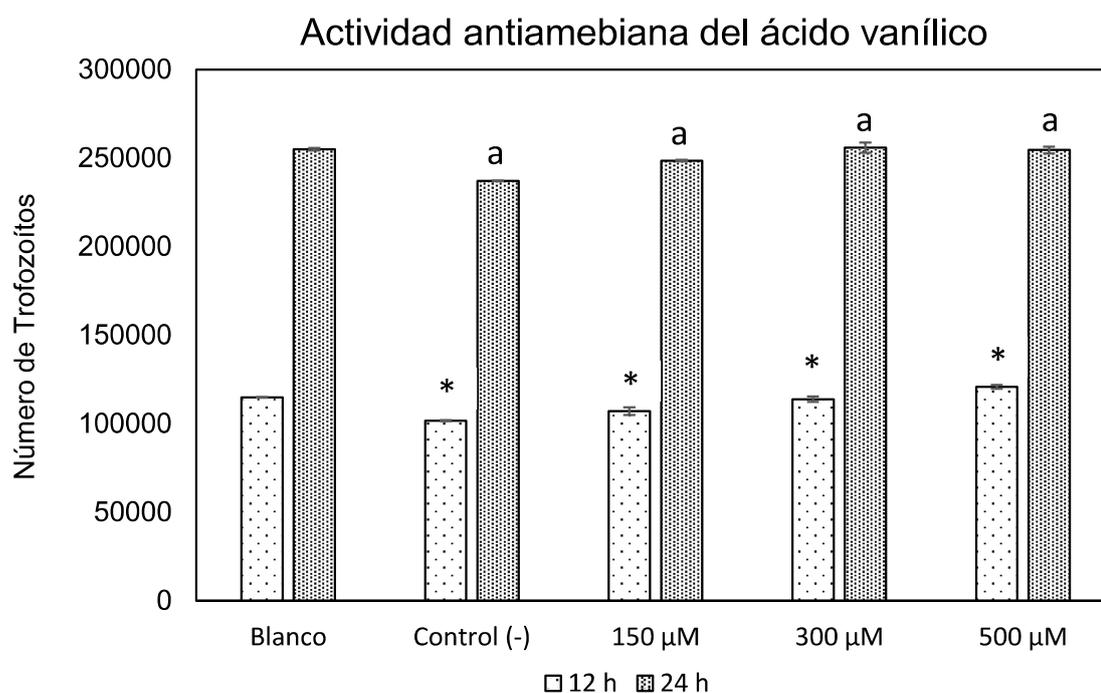


Figura 20. Efecto antiamebiano del ácido vanílico contra trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS. Literales iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al control.

4.15 Actividad tóxica contra *A. salina*

Artemia salina es uno de los organismos de prueba más valiosos disponibles para las pruebas de toxicidad. Debido a la rapidez, conveniencia y bajo costo de los ensayos basados en *Artemia*, se evaluó la toxicidad de los diferentes extractos y fracciones orgánicas de *C. pulverulentus*. Los resultados muestran que no existe efecto tóxico del extracto completo (750-30000 ppm), fracción metanólica (375-15000 ppm) y fracción 8 (25-1000 ppm) sobre nauplios de *A. salina* (Tabla 10) para la prueba de toxicidad aguda en un periodo de 24 h (Rajabi, 2015).

Tabla 10. Prueba de toxicidad de E.E de *Costus pulverulentus* fracciones sobre *Artemia salina*

Extracto completo	Fracción metanólica	[F 8]	Mortalidad (%)
750 ppm	375 ppm	25 ppm	0
1500 ppm	750 ppm	50 ppm	0
3000 ppm	1500 ppm	100 ppm	0
7500 ppm	3750 ppm	250 ppm	0
15000 ppm	7500 ppm	500 ppm	0
30000 ppm	15000 ppm	1000 ppm	0
		CRTL sol'n salina	0
		CRTL sol'n salina + solvente	0

CAPITULO V

DISCUSIÓN

C. pulverulentus (Costaceae) es una especie endémica de América Latina, se distribuye en México, Belice, Guatemala, Cuba, Colombia, Honduras, Costa Rica, Ecuador y Venezuela (Tropicos). En México se ha reportado en Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Villaseñor 2016). Los estudios en *C. pulverulentus* se han enfocado principalmente en su distribución y biología (Guzmán 2015, Sytsma et al 1985). Sin embargo, existen pocos estudios de la actividad biológica y de la química de la planta. Con respecto a la actividad farmacológica se ha demostrado que ésta planta posee potencial como antiveneno, observándose que el Extracto Etanólico de los rizomas de *C. pulverulentus* inhibe la actividad hemolítica del veneno de *Bothrops asper* (Tapia et al., 2018). Por otra parte, se ha demostrado que el Extracto Etanólico de los tallos de *C. pulverulentus* posee actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de próstata PC3, actividad antiinflamatoria y antinociceptiva en modelos de ratón. Así mismo se ha demostrado que no ejerce efectos tóxicos en los modelos evaluados (Alonso-Castro et al., 2016). En lo que respecta a la fitoquímica, los estudios se han centrado en la caracterización del Extracto Etanólico de los tallos en los cuales se ha identificado la presencia de ácidos orgánicos y esteroides (Alonso-Castro et al., 2016), muchos de los cuales poseen actividad antinociceptiva, antiinflamatoria, antiproliferativa y antimicrobiana (Valerio y Awad 2011; Liu et al., 2019; Santos et al. 2013; Walker et al., 2017; Novotny et al., 2017).

En la Huasteca Potosina, *C. pulverulentus* (Costaceae) se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de una afección coloquialmente denominada mal de orín, cuya sintomatología corresponde a una infección de las vías urinarias (IVU) (Andreu et al., 2011). Las IVUs son un problema grave de salud pública y son causadas por una variedad de patógenos, comúnmente por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus saprophyticus*, que afectan aproximadamente a 150 millones de personas cada año en todo el mundo (Flores-Mireles et al., 2015). El uso tradicional de *C. pulverulentus* (Costaceae) para el tratamiento del “mal de orín” sugiere que la planta posee metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana. Por lo que en este trabajo se evaluó la actividad biocida de la planta contra cepas bacterianas que comúnmente

causan IVUs. Adicionalmente se evaluó el efecto contra especies bacterianas cuya resistencia a los antibióticos hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas.

Para llevar a cabo este estudio, se elaboró el Extracto Etanólico (E.E.) de los tallos de *C. pulverulentus*, con la finalidad de identificar el metabolito bioactivo, y se determinó el efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus* sp. Los resultados obtenidos muestran que *E. faecalis* y *Bacillus* sp. presentan moderada sensibilidad al E.E. de *C. pulverulentus*, mientras que las bacterias Gram negativas son resistentes a las dosis evaluadas.

En la mayoría de los estudios antimicrobianos, las bacterias Gram negativas parecen mostrar mayor resistencia a los productos naturales en comparación con las bacterias Gram positivas (Daza-Pérez 1998). Este hecho podría estar relacionado con la complejidad de la membrana de las bacterias Gram negativas (Fuente-Salcido et al., 2015). En el caso de este grupo bacteriano, como alternativa se ha optado por la búsqueda de metabolitos bioactivos con actividad anti quórum sensing (Olivero et al., 2011). Por lo que en este estudio se determinó la actividad anti-QS del E.E. de *C. pulverulentus* en la inhibición de la producción del pigmento violaceína en *C. violaceum* CV026. Los resultados obtenidos mostraron que la producción de violaceína no se afecta por el E.E., indicando que el extracto de *C. pulverulentus* no posee compuestos anti-QS. Sin embargo, muestra efecto inhibitor de crecimiento de *C. violaceum* CV026 a una dosis de 10 µg/disco generando un halo de inhibición de 12 mm en la placa inoculada.

La caracterización química del extracto muestra la presencia de carbohidratos, ácidos orgánicos y esteroides, de manera similar a lo reportado previamente (Alonso-Castro et al., 2016). Entre los ácidos orgánicos se identificaron compuestos fenólicos, a los cuales se ha atribuido actividad antimicrobiana (Creus, 2004). En este trabajo las dosis evaluadas del E.E. de *C. pulverulentus* ejercen moderada actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*, *Bacillus* sp. y *C. violaceum* CV026.

Para determinar el o los metabolitos bioactivos, responsables del efecto antimicrobiano, se realizó el fraccionamiento del E.E. de *C. pulverulentus* (Costaceae) utilizando solventes de diferente polaridad (hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol) con la finalidad de purificar y separar los compuestos contenidos en la mezcla, posteriormente se

determinó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas. Los resultados obtenidos muestran que la fracción metanólica conserva la actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*, *Bacillus* sp. y *C. violaceum* CV026, mientras que el resto de las fracciones no mostraron efectos inhibitorios. Los resultados sugieren que los compuestos bioactivos son de naturaleza polar.

La fracción metanólica se purificó mediante cromatografía en columna con el fin de obtener el metabolito bioactivo responsable de la actividad antimicrobiana. Se obtuvieron 32 fracciones y se evaluó la actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos mostraron que solo la fracción 8 (F8) conservó la actividad biocida contra *Bacillus* sp., indicando que en esta fracción se encuentra el metabolito bioactivo. En lo que respecta a *C. violaceum* CV026 ninguna de las fracciones mostró efecto inhibitorio, sugiriendo que la actividad biocida de la F8 se debe al efecto sinérgico de los compuestos presentes en la misma. Adicionalmente, la F8 inhibe el desarrollo de *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* Ox^R, sin embargo, a las dosis evaluadas carece de efecto inhibitorio contra las bacterias Gram negativas evaluadas.

El análisis de la F8 mediante GC-MS muestra la presencia de 16 picos, indicando que la cromatografía en columna no resuelve los metabolitos presentes en esta fracción. De acuerdo al análisis, la F8 contiene mayoritariamente tres compuestos del grupo de los polifenoles, los ácidos p-cumárico, vanílico y p-hidroxibenzoico, los cuales podrían ser responsables del efecto antimicrobiano de la F8 contra *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* Ox^R. Para determinar el efecto individual de los compuestos presentes en la F8 se seleccionaron los dos ácidos mayoritarios, el ácido p-cumárico y el ácido vanílico.

La CMI para los ácidos orgánicos se determinó mediante diluciones 1:2 de acuerdo a Cos et al. (2009). Los resultados mostraron que el ácido p-cumárico posee actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 29213 a una CMI de 250 µg/mL. El efecto del ácido p-cumárico contra *S. aureus* es controversial, debido a que los estudios al respecto, reportan dosis de CMI diferentes entre sí, lo cual puede deberse a la técnica utilizada y a las cepas evaluadas en las determinaciones. Alves et al. (2013) sugiere que el ácido p-cumárico ejerce actividad antimicrobiana contra *S. aureus* sensible (MSSA) y resistente a meticilina (MRSA) a una CMI superior a 1000 µg/mL, mientras Kozyra et al. (2019) no encontró actividad del ácido p-cumárico contra las cepas tipo de *S. aureus* ATCC 6538 y *S. aureus* ATCC 25923. Por otra

parte, Krishna et al. (2014) muestra que 200 µg de ácido p-cumárico generan un halo de inhibición en el desarrollo de *S. aureus* mediante pruebas de difusión en disco. En *S. epidermidis*, se determinó una CMI de 1000 µg/mL, similar a la reportada previamente para la cepa tipo *S. epidermidis* ATCC 12228 (Kozyra et al. 2019), e inferior a la reportada por Alves et al. (2013) quienes sugieren que la CMI para *S. epidermidis* es superior a 1000 µg/mL.

En lo que respecta a las bacterias Gram negativas, para *P. aeruginosa* ATCC 30298 se determinó una CMI de 500 µg/mL. Hasta el momento no existen reportes donde se determine la actividad del ácido p-cumárico contra esta bacteria. Sin embargo, se ha demostrado que el ácido p-cumárico a 61.0 µM inhibe el desarrollo de *Pseudomonas putida* en un 33 % (Rühl et al. 2009). En lo que respecta al resto de los microorganismos Gram negativos se determinó una CMI de 1000 µg/mL para *E. coli* ATCC 15597, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, mientras que *P. mirabilis* resultó la bacteria más resistente con una CMI superior a 1000 µg/mL. En estudios previos se demostró el potencial antibacteriano del ácido p-cumárico contra *E. coli* con una CMI de 1000 µg/mL, similar a la dosis obtenida en este trabajo (Alves et al. 2013).

En general se ha demostrado que el ácido p-cumárico ejerce actividad antibacteriana incrementando significativamente la permeabilidad de la membrana externa y la membrana plasmática (Lou et al., 2012). Así mismo, se ha sugerido que se une al ADN genómico bacteriano para inhibir las funciones celulares (Lou et al. 2012). Debido a sus propiedades antibacterianas el ácido p-cumárico se ha evaluado en sistemas alimentarios como agente conservador e inhibidor de crecimiento de *S. aureus*, principal contaminante de alimentos (Stojković et al., 2013). Se ha demostrado que el ácido p-cumárico a concentraciones de 0.23 a 1.87 µg/mL inhibe *in situ*, en caldo de pollo y carne de cerdo preparadas, el crecimiento de *S. aureus* durante un período de 72 h. Además, del efecto inhibitorio el ácido p-cumárico mejora las características organolépticas de los alimentos, lo que pone de manifiesto su utilidad como conservante y potenciador de sabor para la industria alimentaria (Stojković et al. 2013).

En lo que respecta al ácido vanílico se determinó que las concentraciones utilizadas no inhibieron el desarrollo de los microorganismos Gram positivos evaluados, sugiriendo que la CMI es superior a 1000 µg/mL. Las dosis determinadas en este estudio son similares a las

reportados por Kozyra et al. (2019) para *S. epidermidis* ATCC 12228, quienes demuestran que la CMI es superior a 1000 µg/mL. Por otro lado, se ha demostrado que el ácido vanílico no inhibe el desarrollo de las cepas tipo, *S. aureus* ATCC 6538 y *S. aureus* ATCC 25923 (Kozyra et al. 2019). Sin embargo, Alves et al. (2013) demostraron una CMI de 1000 µg/mL y 500 µg/mL de ácido vanílico para *S. aureus* sensible (MSSA) y resistente a meticilina (MRSA), respectivamente. *S. aureus* MRSA es agente causal de infecciones nosocomiales de tratamiento difícil debido a la aparición de cepas resistentes y a la poca disponibilidad de antibióticos eficientes (Chambers 2001). Por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas para el control de este microorganismo. En este sentido se ha demostrado que el ácido vanílico actúa como inhibidor de la PBP2a MecA transpeptidasa de peptidoglicano resistente a betalactámicos en *S. aureus* MRSA (Alves et al. 2013), siendo una excelente alternativa para el tratamiento antibacteriano. Pese a que, en este trabajo no se encontró actividad antibacteriana significativa del ácido vanílico contra las cepas disponibles de *S. aureus*, nuestros resultados muestran que *C. pulverulentus* es una fuente potencial de ácido vanílico que puede ser utilizada para el tratamiento de infecciones causadas por MRSA.

En lo que respecta a las bacterias Gram negativas, la CMI de ácido vanílico es superior a 1000 µg/mL, estos resultados difieren del efecto inhibitorio reportado por Alves et al. (2013) con una CMI de 1000 µg/mL para *E. coli* y *P. mirabilis* (Alves et al. 2013).

Adicionalmente se realizó una mezcla de ácido p-cumárico y ácido vanílico en una proporción similar a la identificada en la F8. La mezcla se evaluó con el fin de determinar si la combinación de compuestos potenciaba la actividad antimicrobiana. Sin embargo, la actividad disminuyó debido a que se redujo la concentración del ácido p-cumárico. Esto sugiere que ácido p-cumárico es el principal responsable de la actividad antibacteriana de la F8.

El ácido p-cumárico y el ácido vanílico son compuestos que ejercen actividad antiinflamatoria al regular la activación del factor Nf-κβ (Zhao et al. 2016, Zhu et al. 2018, Calixto-Campos et al 2015). Se ha demostrado que algunos compuestos con potencial antiinflamatorio también ejercen actividad amebicida debido a que causan distorsión en la integridad de la membrana de *E. histolytica* (Pais-Morales et al., 2016; Rangel-Castañeda, 2018). Estudios previos han llevado a cabo la caracterización de los compuestos presentes en

Peucedanum longibracteolatum y se ha demostrado que el extracto metanólico de las hojas posee efecto amebicida contra trofozoítos de *E. histolytica*; siendo los ácidos o-cumárico, p-cumárico y vanílico los principales componentes del extracto y los posibles responsables del efecto amebicida (Degerli y Tepe 2015). Con el objetivo de determinar la actividad antiamebiana del ácido p-cumárico y del ácido vanílico, se evaluaron diferentes dosis en un cultivo axénico de *E. histolytica* HM1-IMSS. Los resultados obtenidos muestran que solo el ácido p-cumárico ejerce actividad amebostática significativa ($p < 0.05$) en las dosis de 300 μM (49 $\mu\text{g/mL}$) y 500 μM (82 $\mu\text{g/mL}$). Así como una dosis inhibitoria 50 (DI_{50}) estimada en 712.64 μM (116 $\mu\text{g/mL}$), dicha dosis es menos efectiva que el antiparasitario de referencia (metronidazol, 0.25 $\mu\text{g/mL}$). Sin embargo, el metronidazol se ha asociado con efectos adversos a la salud en el hombre y en animales de experimentación (Bendesky et al., 2002; Dobias et al., 1994; Finegold, 1980; Kusumi et al., 1980; Rosenblatt y Edson, 1983, Caylor y Cassimatis, 2001; Dow et al., 1989). Adicionalmente, la venta sin receta y el uso indiscriminado de metronidazol está dando como consecuencia la aparición de resistencia en *E. histolytica* (Bansal et al., 2006; Genetu Bayih et al., 2017). Por lo que es necesario contar con alternativas seguras para el tratamiento de esta parasitosis, siendo el ácido p-cumárico una alternativa que puede explorarse debido a sus propiedades. No obstante, es necesario realizar estudios adicionales con dosis más elevadas y determinar a nivel estructural mediante microscopía electrónica de barrido, los efectos del ácido p-cumárico en trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS.

Finalmente, respecto a la toxicidad del ácido p-cumárico, se ha reportado una dosis letal 50 (LD_{50}) de 2850 y 1160 mg/kg por vía oral e intraperitoneal, respectivamente, causando somnolencia y depresión respiratoria en modelos murinos (Gangolli 2007). Adicionalmente en las pruebas de toxicidad aguda con el modelo de *A. salina* a las concentraciones evaluadas no mostraron efecto tóxico. Por tanto, el ácido p-cumárico es una alternativa natural con potencial aplicación.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

El extracto completo y fracción etanólica de *Costus pulverulentus*, adicionalmente a las actividades reportadas previamente muestra capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias de importancia médica principalmente sobre *S. aureus*. En el posterior fraccionamiento en columna, únicamente la fracción número 8 mantiene actividad, contra *Bacillus* sp. y *S. aureus* ATCC 29213 y Ox resistente en concentraciones de 30 µg/disco, mostrando una susceptibilidad media según los criterios de la CLSI. Posterior a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas la actividad antimicrobiana se adjudica a los metabolitos mayoritarios de la fracción 8 los cuáles son ácido vanílico y ácido p-cumárico que son compuestos químicos de carácter polar provenientes del metabolismo secundario de la planta y que pueden clasificarse como compuestos fenólicos. La prueba de microdilución en placa muestra que el compuesto con mayor actividad es el ácido p-cumárico sobre *S. aureus* ATCC 29213 a una concentración de 250 mg/L.

La evidencia nos permite sugerir la ausencia de toxicidad aguda del extracto completo y las fracciones evaluadas en la prueba de estandarizada con *A. salina*.

El Extracto Etanólico y las fracciones obtenidas a partir *C. pulverulentus* no mostraron actividad anti-QS sobre *C. violaceum* CV026 a concentraciones de 10 y 30 µg/disco, sin embargo, si se observa inhibición de crecimiento a pesar de que la cepa tiene genes de resistencia a kanamicina, el antibiótico usado como control.

De los metabolitos considerados bioactivos presentes en la fracción 8 únicamente el ácido p-cumárico muestra actividad amebostática contra *Entamoeba histolytica* a concentraciones de 300 µM (49 µg/mL) y 500 µM (82 µg/mL) y dosis inhibitoria 712.64 µM (116 µg/mL).

CAPITULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Castro, A. J., Dominguez, F., Morales, J., y Carranza-Alvarez, C. (2015). Plants used in the traditional medicine of Mesoamerica (Mexico and Central America) and the Caribbean for the treatment of obesity. *Journal of ethnopharmacology*. 175. 10.1016/j.jep.2015.09.029.
- Alonso-Castro, A. J., Zapata-Morales, J. R., González-Chávez, M. M., Carranza-Álvarez, C., Hernández-Benavides, D. M., y Hernández-Morales, A. (2016). Pharmacological effects and toxicity of *Costus pulverulentus* C. Presl (Costaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 180, 124-130.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Martins, A., y Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of applied microbiology*, 115(2), 346-357.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 163–171.
- Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., y Lepe, J. A. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 52-57.
- Angeles-R., M. C., Morales-J, A. C., y Yacarini-M, A. E. (2020). Resistencia a los antibióticos: Agravamiento en la situación de salud pública. *Revista del Cuerpo Médico del HNAAA*, 13(1), 99-100. doi:10.35434/rcmhnaaa.2020.131.632
- Avelino-Flores, M. (2005). Evaluación de la actividad antiproliferativa de extractos de cinco plantas medicinales de la región de Cuetzalan, Puebla, sobre una línea celular de cáncer cervicouterino. En Master in Sciences thesis. Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada, Tlaxcala, México.
- Ávila, G. Z. (2012). Efecto antimicrobiano y tóxico del extracto de *Achillea millefolium* L. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., y otros. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant material: A review. *Journal of Food Engineering* (117), 426-436.

- Balouiri , M., Sadiki, M., y Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 71-79.
- Balunas, M., y Kinghorn, A. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431-441.
- Bansal, D., Malla, N. y Mahajan, R. C. (2006). Drug resistance in amoebiasis. *Indian Journal of Medical Research* 123, 115-118.
- Bendesky, A., Menendez, D. y Ostrosky-Wegman, P. (2002). Is metronidazole carcinogenic? *Mutat Res* 511, 133-144.
- Brahmkshatriya, P., y Brahmkshatriya, P. (2013). Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications. En K. Ramawat, y J. Mérillon, *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes.* (págs. 2665-2692). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- BSAC. (2013). *BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing.* British Society for Antimicrobial Chemotherapy.
- Calderon-Rojas, G., y Aguilar-Ulalde, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antinbióticos con menor actividad. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA*, LXXIII (621), 757-763.
- Calixto-Campos, C., Carvalho, T. T., Hohmann, M. S., Pinho-Ribeiro, F. A., Fattori, V., Manchope, M. F., ... y Verri Jr, W. A. (2015). Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NFκB activation in mice. *Journal of natural products*, 78(8), 1799-1808.
- Castillo, G. E., y Martinez, S. I. (2007). *Manual de fitoterapia.* España: Elsevier.
- Caylor, K. B. y Cassimatis, M. K. (2001). Metronidazole neurotoxicosis in two cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 37, 258-262.
- Chambers, H. F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 178.
- Cohen, F. L., y Tartasky, D. (1997). Microbial resistance to drug therapy: a review. *American Journal of Infection Control*, 51-64.

- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., y Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *Journal of Ethnopharmacology* (106), 209-302.
- Coyle, M. B. (2005). *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology.
- Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *O F F A R M*, 23 (6), 80-84.
- Croteau, R., Kutchan, T., y Lewis, N. (2000). Natural products (secondary metabolites). En B. Buchanan, W. Gruissem, y R. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (págs. 1250-1318). Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Degerli, S., y Bektas, T. E. P. E. (2015). Phenolic Acid Composition and Anti-Parasitic Effects of Four Peucedanum Species on *Entamoeba histolytica* Trophozoites. *Iranian journal of parasitology*, 10(3), 420.
- Deogade, M., Wanjari, A., Lohakare, S., (2014). Pharmacognostical and Phytochemical study of *Costus igneus* NE Br leaf Original Article. *Journal of Indian System of Medicine*. 2. 174-178.
- Dobias, L., Cerna, M., Rossner, P. y Sram, R. (1994). Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutat Res* 317, 177-194.
- Doughari, J. (2012). Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. En V. Rao, *Phytochemicals in A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*.
- Dow, S. W., LeCouteur, R. A., Poss, M. L. y Beadleston, D. (1989). Central nervous system toxicosis associated with metronidazole treatment of dogs: five cases (1984-1987). *J Am Vet Med Assoc* 195, 365-368.
- Dow, S. W., LeCouteur, R. A., Poss, M. L. y Beadleston, D. (1989). Central nervous system toxicosis associated with metronidazole treatment of dogs: five cases (1984-1987). *J Am Vet Med Assoc* 195, 365-368

- Duraipandiyan, V., Al-Harbi, N. A., Ignacimuthu, S., y Muthukumar, C. (2012). Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 13.
- Dziedzic, S. Z., y Hudson, B. J. (1984). Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*, 14(1), 45-51.
- Elizondo-Luévano, J. H., Castro-Ríos, R., Sánchez-García, E., Hernández-García, M. E., Vargas-Villarreal, J., Rodríguez-Luis, O. E., y Chávez-Montes, A. (2018). In Vitro Study of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018.
- Fernández-Sánchez, A., Arismendi-Jaime, E. R., y Fajardo-Santana, M. S. (2019). Resistencia antimicrobiana: conocimiento y uso de antibióticos en población usuaria de hospital público, Morelos, México. *Parainfo Digital*, 13(29), 1. Obtenido de <http://ciberindex.com/c/pd/e026>
- Finegold, S. M. (1980). Metronidazole. *Ann Intern Med* 93, 585-587.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., y Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, 13(5), 269-284.
- Gangolli, S. D. (Ed.). (2007). *The dictionary of substances and their effects (DOSE)*. Royal Society of chemistry.
- Garrity, G.M., Bell, J.A. y Lilburn, T.G. (2005). Taxonomic outline of the prokaryotes *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, Michigan State University.
- Genetu Bayih, A., Debnath, A., Mitre, E. y other authors (2017). Susceptibility Testing of Medically Important Parasites. *Clin Microbiol Rev* 30, 647-669.
- González-Mendoza, J., Maguiña-Vargas, C., y González-Ponce, F. M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peruana*, 36(2), 145-151.

- Guzmán Q, J. A. (2015). Ecological advantage of leaf heteroblasty in *Costus pulverulentus* (Costaceae). *Botany*, 93(3), 151-158.
- Harborne, J. R. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry (Cuarta ed.). Londres: AcademicPress, Elsevier.
- Hayat, F., Azam, A. y Shin, D. (2016). Recent progress on the discovery of antiamoebic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 26, 5149-5159.
- Heinrich, M. (2010). Ethnopharmacology and drug development. (L. L.-W. Mander, Ed.) In *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*(3), 351-381.
- Hernández-Calderón, D. V., y Hernández-González, A. A. (2016). Resistencia a los antibióticos, una amenaza latente. *Revista Aire Libre*, 4, 29-40. doi:10.33132/23573783.1014
- Herrera-Martínez, M., Hernández-Ramírez, V. I., Hernández-Carlos, B., Chávez-Munguía, B., Calderón-Oropeza, M. A., y Talamás-Rohana, P. (2016). Antiamoebic activity of *Adenophyllum aurantium* (L.) Strother and its effect on the actin cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in pharmacology*, 7, 169.
- Ingraham, J. (1998). Introducción a la microbiología. (Vol. II). Barcelona, España: Reverte.
- Juárez-Vázquez, M., Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., González-Alcaraz, V. F., Bravo-Acevedo, E., Chamarro-Tinajero, F. J., y Solano, E. (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 521-527.
- Juneja, V. K., Dwivedi, H. P., y Yan.X. (2012). Novel Natural Food Antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 381-403.
- Kozyra, M., Komsta, Ł., y Wojtanowski, K. (2019). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from inflorescences of *Carduus* sp. *Phytochemistry letters*, 31, 256-262.
- Krishna, N. A. V., Nadeem, M. D., Saradhi, M. P., Mahendran, B., y Bharathi, S. (2014). Cumulative activity of the p-coumaric acid and syringaldehyde for antimicrobial activity of different microbial strains. *European Journal of Experimental Biology*, 4, 40-43.

Kusumi, R. K., Plouffe, J. F., Wyatt, R. H. y Fass, R. J. (1980). Central nervous system toxicity associated with metronidazole therapy. *Ann Intern Med* 93, 59-60.

la Fuente-Salcido, D., Margarita, N., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., y García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(2), 7-16.

Lattazio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. En K. G. Ramawat, y J. M. Mérillon, *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. (págs. 1543-1580). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Lentz, D. L., Clark, A. M., Hufford, C. D., Meurer-Grimes, B., Passreiter, C. M., Cordero, J., . . . Okunade, A. L. (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 63, 253-263.

Leonti, M., Vibrans, H., Sticher, O., y Heinrich, M. (2001). Ethnopharmacology of the Popoluca, Mexico: an evolution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1653-1669.

Liu R, D Hao, W Xu, J Li, X Li, D Shen, K Sheng, L Zhao, W Xu, Z Gao et al. (2019). β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice. *Pharm Biol*. 57: 161-168. doi:10.1080/13880209.2019.1577461

Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., y Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food control*, 25(2), 550-554.

Lüllman, H., Mohr, K., y Hein, L. (2010). *Farmacología*. Madrid: Médica Panamericana.

Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., y Fauci, A. S. (2016). Resistencia antimicrobiana. *JAMA*, 316(11), 1193–1204. doi:10.1001 / jama.2016.11764

Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., y Bakri, M. M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361-366.

Novotny L, ME Abdel-Hamid, L Hunakova. (2017). Anticancer potential of β -Sitosterol. *Int J Clin Pharmacol Pharmacother*. <https://doi.org/10.15344/2456-3501/2017/129>

OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud.

- OMS. (2017). ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? Preguntas y respuestas en línea. Obtenido de Organización mundial de la salud: <https://www.who.int/features/qa/75/es/>
- OMS. (Septiembre de 2016). Resistencia a los antimicrobianos. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Olivero, J. T., Pájaro, N. P., y Stashenko, E. (2011). ANTIQUORUM SENSING ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS ISOLATED FROM DIFFERENT SPECIES OF THE GENUS *Piper*. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 18(1), 77-82.
- Pais-Morales, J., Betanzos, A., Garcia-Rivera, G., Chavez-Munguia, B., Shibayama, M. y Orozco, E. (2016). Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents In Vitro and In Vivo Virulence of *Entamoeba histolytica*. *PLoS One* 11, e0146287.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., y Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Ponce de León-Rosales, S., Arredondo-Hernández, R., y López-Vidal, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta Médica de México.*, 151, 681-689. Recuperado el 12 de Junio de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2015/gm155r.pdf>
- Prakash, V. y Bhimji, S. S. (2018). Abscess, Amebic Liver. In StatPearls. Treasure Island (FL).
- Pulido-Ortega, J., Talamás-Rohana, P., Muñoz-Ortega, M. H., Aldaba-Muruato, L. R., Martínez-Hernández, S. L., del Rosario Campos-Esparza, M., ... y Ventura-Juárez, J. (2019). Functional characterization of an interferon gamma receptor-like protein on *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity*, 87(11), e00540-19.
- Rahman, M. M., Shahriar, M. R., Meghla, N. S., Ishika, T., Roy, P. C., y Kamruzzaman, M. (2017). Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts against Gram positive and Gram negative bacteria in Bangladesh. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 3(4), 405-411.
- Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., y Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(20).

- Ramiro-Fonegra, G., y Jiménez, R. S. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia.
- Rangel-Castañeda, I. A., Hernández-Hernández, J. M., Pérez-Rangel, A., González-Pozos, S., Carranza-Rosales, P., Charles-Niño, C. I., Tapia-Pastrana, G., Ramírez-Herrera, M. A. y Castillo-Romero, A. (2018). Amoebicidal activity of curcumin on *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Pharm Pharmacol* 70, 426-433.
- Rasooli, I. (2007). Food preservation: a bio preservative approach. *Food*, 1, 111-136.
- Ríos, L., y Recio, C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.
- RM, D. P. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 22, 57-67.
- Rosenblatt, J. E. y Edson, R. S. (1983). Metronidazole. *Mayo Clin Proc* 58, 154-157.
- Rühl, J., Schmid, A., y Blank, L. M. (2009). Selected *Pseudomonas putida* strains able to grow in the presence of high butanol concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(13), 4653-4656.
- Salim, A., Chin, Y., y Kinghorn. (2008). Drug discovery from plants. En K. Ramawat, y J. Mérillon, *Bioactive molecules and medicinal plants* (págs. 1-24). Springer.
- Santos CCdMP, MS Salvadori, VG Mota, LM Costa, AAC de Almeida, GAL de Oliveira, JP Costa, DP de Sousa, RM de Freitas, RN de Almeida. 2013. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol *in vivo* and *in vitro* models. *Neurosci J*. 2013: 949452-949452. doi:10.1155/2013/949452
- Sawangjaroen, N., Phongpaichit, S., Subhadhirasakul, S., Visutthi, M., Srisuwan, N., y Thammapalerd, N. (2006). The anti-amoebic activity of some medicinal plants used by AIDS patients in southern Thailand. *Parasitology Research*, 98(6), 588-592.
- Sharma, P., y Sharma, J. D. (2001). A review of plant species assessed *in vitro* for anti-amoebic activity or both anti-amoebic and antiplasmodial properties. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 15(1), 1-17.

Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J., y Petrović, S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3205-3208.

Sytsma, K. J., y Phippen, R. W. (1985). Morphology and pollination biology of an intersectional hybrid of *Costus* (Costaceae). *Systematic botany*, 353-362.

Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. (Tercera ed.). Editorial Publicaciones Universitat Jaume.

Tapia, W., Garzón, K., Granda, N., y Mátyás, B. (2018). Alexiteric activity of *Costus pulverulentus* C. Presl., *Desmodium adscendens* (Sw.) DC., *Begonia glabra* Aubl. and *Equisetum bogotense* on the poison of *Bothrops asper* (equis). *F1000Research*, 7(136), 136.

Tena, D., González-Praetorius, A., Gimeno, C., Pérez-Pomata, M. T., y Bisquert, J. (2007). Infección extraintestinal por *Aeromonas* sp.: revisión de 38 casos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 25(4), 235-241.

Tropicos 2020 <https://www.tropicos.org/>

Valerio M, AB Awad. 2011. β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* 11: 1012-1017. doi:10.1016/j.intimp.2011.02.018

Walker CIB, SM Oliveira, R Tonello, MF Rossato, E da Silva Brum, J Ferreira, G Trevisan. 2017. Anti-nociceptive effect of stigmasterol in mouse models of acute and chronic pain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 390: 1163-1172. doi:10.1007/s00210-017-1416-x

Zavala-Ocampo, L. M., Vargas-Solís, R. C., Chimal-Hernández, A., Ramírez-Moreno, M. E., y Gómez-Hernández, J. A. (2013). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas en la región de Catemaco, Veracruz, México. *Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente (Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, México)*, 2, 17-31.

Zhao, Y., Liu, J., Liu, C., Zeng, X., Li, X., y Zhao, J. (2016). Anti-inflammatory effects of p-coumaric acid in LPS-stimulated RAW264. 7 cells: Involvement of NF- κ B and MAPKs pathways. *J Med Chem*, 6, 327-30.

Zhu, H., Liang, Q. H., Xiong, X. G., Wang, Y., Zhang, Z. H., Sun, M. J., ... y Wu, D. (2018). Anti-inflammatory effects of p-coumaric acid, a natural compound of *Oldenlandia diffusa*, on arthritis model rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.