



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**“IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
PLANTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR CON ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA EN CEPAS DE INTERÉS CLÍNICO, Y
SU POTENCIAL USO FARMACOLÓGICO”**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Amaral de Jesús Llamas García

La Paz, Baja California Sur, junio 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 31 del mes de Mayo del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" Identificación de metabolitos secundarios de plantas de Baja California Sur con actividad antibacteriana en cepas de interés clínico, y su potencial uso farmacológico "


Presentada por el alumno:

Amaral de Jesús Llamas García

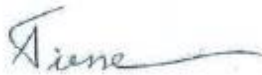
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

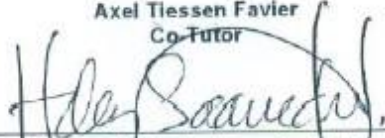
LA COMISIÓN REVISORA


Gracia Alicia Gómez Anduro
Director de Tesis


Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Co-Tutor



Axel Tiessen Favler
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Seavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Director de Tesis

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Tutor de Tesis

Dr. Axel Tiessen Favier

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato.

Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Axel Tiessen Favier

Jurado de Examen

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Axel Tiessen Favier

Suplente de Jurado de Examen

Dr. Pablo Misael Arce Amezcuita

Resumen

Uno de los problemas recurrentes en la salud son las infecciones, las cuales pueden ser causadas por microorganismos resistentes a fármacos antimicrobianos (IMSS, 2014). Las plantas medicinales se utilizan para el tratamiento de diversos padecimientos como las infecciones, con esto los productos naturales de las plantas como compuestos puros o extractos crudos nos proveen un sin número de oportunidades para el descubrimiento de nuevas drogas debido a su gran diversidad química. Los metabolitos secundarios de plantas se clasifican en tres grandes grupos de moléculas: Terpenos, Compuestos fenólicos y Alcaloides, los cuales presentan diversas propiedades, entre las cuales destacan las medicinales. En el presente trabajo se realizaron pruebas con extractos etanólicos de plantas pertenecientes a la flora representativa de la medicina tradicional del estado de Baja California Sur, México, contra: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Listeria innocua* ATCC 33090. y *Acinetobacter baumannii* complex, utilizando el método de difusión en agar con discos. ésta última con características de multidrogoresistente. A estos extractos se les evaluó su actividad antibacteriana utilizando el método de Kirby-Bauer por difusión en agar resultando susceptibles: *S. aureus*, al ser expuesta a los extractos de *P. articulata*, *L. candida*, *L. schottii*, y *B. odorata*; *L. monocytogenes* fue inhibida por *P. articulata*, *L. schottii*, y *B. odorata*; y por último *E. coli* resultó inhibida por el extracto de *L. schottii*. Los extractos con actividad se fraccionaron por método de separación líquido-líquido resultando fracciones activas en *S. aureus*: fracción acuosa de *P. articulata* y *L. candida*; fracción de acetato de etilo de *L. candida*; Fracción de diclorometano de *L. schottii*, y fracción de EtOAc de *Euphorbia* sp. En *L. monocytogenes*, la fracción acuosa de *P. articulata* mostró actividad; la fracción acuosa de *L. schottii* fue la única en inhibir el crecimiento de *E. coli*. Debido a la diversa actividad de los metabolitos secundarios, se realizó un ensayo de toxicidad en *A. salina* para determinar la DL₅₀ de cada uno de los concentrados y fracciones con actividad antibacteriana, resultando con una toxicidad moderada a alta los extractos de *P. articulata* y *L. schottii*. Obtenida la actividad antibacteriana y la toxicidad se caracterizaron los extractos y fracciones por medio de DIESI-MS acoplado con la ayuda del lenguaje de programación en R los iones más representativos en Heatmaps.

Palabras clave: Extractos de plantas, Metabolitos secundarios de plantas, bacterias de interés clínico, Actividad antimicrobiana, DIESI-MS, Iones.



Vo.Bo. Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Director de tesis

Summary

Infections are one of the most important issues on human health, often caused by drug resistant microorganisms (IMSS 2014). Medicinal plants are commonly used against certain diseases, like infections; having said, natural products from plants as crude extracts or purified molecules provide endless opportunities for drug discovery due its extense chemical diversity. Plant secondary metabolites are often classified in three groups: Terpenes, Phenolic compounds, and Alkaloids, which display many properties, medical employment stand out as one of the most important. In this investigation ethanolic extracts from folk medicine of Baja California Sur, México, were tested for its antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Acinetobacter baumannii* complex. Antibacterial activity of extracts were evaluated by the Kirby-Bauer agar disc difussion method. *P. articulata*, *L. candida*, *L. schottii*, and *B. odorata* showed antibacterial activity against *S. aureus*; while *L. monocytogenes* was susceptible to *P. articulata*, *L. schottii*, and *B. odorata* extracts. *L. schottii* extract was the only extract which inhibited *E. coli* growth. Liquid-Liquid fractionation of active extracts was achieved. *S. aureus* growth was inhibited by H₂O fraction of *P. articulata*, and *L. candida*; EtOAc fraction of *L. candida*, CH₂Cl₂ fraction of *L. schottii*, and EtOAc fraction of *Euphorbia* sp. *L. monocytogenes* growth was inhibited by the H₂O fraction of *P. articulata*. And *E. coli* was only inhibited by H₂O fraction of *L. schottii*. Antibacterial activity was complemented by brine shrimp (*A. salina*) toxicity assay, on which median lethal dose (LD₅₀) was achieved. Only *P. articulata* and *L. schottii* extracts (H₂O fraction and concentrated extract, respectively) exhibited high toxicity <100 µg/ml. Direct Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry was used to superficially determine the most abundant metabolites of the extracts. Using R-language most abundant ions of the sample were coupled on heatmaps.

Keywords: *Plant Extracts, Plant secondary metabolites, clinically important bacteria, Antibacterial activity, DIESI-MS, Ions*



Vo.Bo. Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Director de tesis

Dedicatoria

A mi abuelito Ángel, Q.E.P.D., por mostrarme el maravilloso mundo de la ciencia. Siempre estarás en mis recuerdos.

Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a toda mi familia por su gran apoyo. A mis hermanas Tita, Marce, y Mary. A mis sobrinos Erick, Daniel, Marely, Marifer, y Nathalia. A mis cuñados Chas y Orlando. Todos me han dado su mano en diferentes situaciones. ¡Muchas gracias!

A mi mamá, a la cuál le podría hacer un documento más extenso que todo lo que podré escribir en mi vida y jamás terminaría de relatar lo asombrosa que es. ¡Te amo, jefa!

A mi papá, que con sus virtudes y defectos me ha enseñado a lo largo de mi vida como ser un buen ser humano. Gracias por todo, pa, ¡también te amo!

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR por otorgarme la oportunidad de realizar un posgrado.

Al CONACYT por la beca otorgada número 591488 para la realización de mis estudios.

A mi comité: Dra. Gracia Gómez por su paciencia y apoyo como tutor académico y como persona, Dra. Thelma Castellanos por siempre darme la mano y motivarme a seguir con esta investigación. Dr. Axel Tiessen por todo el apoyo prestado en mi estancia en Irapuato, Gto. Y por sus ideas para el desarrollo de mi investigación.

Al Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, especialmente al M.C. Angel Carrillo por todo el conocimiento y ayuda otorgada.

Un agradecimiento muy especial Laboratorio de Farmacognosia UABCS: Dr. Pablo Arce, M.C. Francisco Nieto, que me prestaron un pedacito de su laboratorio y su tiempo. Al IBQ Omar.

Fundación de Farmacognosia y Medicina Complementaria y Alternativa de B.C.S., A.C.: Dra. Rosalba Encarnación Dimayuga, por siempre considerarme en sus cursos, y regalarme excelentes consejos y motivación. Al M.C. Jorge Agúndez.

Al Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos UABCS, especialmente a la Dra. Maurilia Rojas Contreras por siempre hacer espacio en su ocupadísima agenda para ayudarme con mis dudas académicas, y como suegra el siempre apoyarme, aconsejarme, y por aguantar mi palabrería insesante. Le agradezco de todo corazón.

Laboratorio de Genómica y Bioinformática: al Dr. Ricardo Vázquez. Increíble ser humano. Gracias por recibirme en su familia chiquita y en su familia Vázquez Juárez. Nunca terminaré de agradecerle todo lo que ha hecho por mi y por Ale.

A mis compañeros de LABCyTA: Irán, Agustín, Giovanna, Saúl, Macario, Alejandro, Isma.

Laboratorio de Biología Molecular de Plantas: M.C. Carolina Garciglia, Dr. Mario Rojas, M.C. Julio Hernández, M.C. Héctor Garza.

Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Molecular del CINVESTAV, Unidad Irapuato: Dr. Jesús Torres, Ing Agr. Cecilia Morales.

A mis roomies en mi estancia en Irapuato: Ale Chamorro, Chucho, Jaz.

A mis compañeros de maestría y doctorado del CIBNOR (Con temor a que me falten): Nuria, César, Emilio, Daniel, Leila, Tom, Paulina, Caroli, José Luis, Tai Coh, Yaredh, Isaí, Alfredo, Chuy Flores (traicionero del CICIMAR).

A mi gordo, Rigel, por su gran amistad. Nunca cambies, gordo.

A la vieja guardia: 12 o 13 años siendo amigos. Chuy, Karlo, Pablo, Isa, Mike, Rafa. Relataría a detalle todos los momentos que hemos vivido juntos, pero definitivamente la ley me encontraría culpable y cumpliría algunos años de cárcel; y obviamente ustedes también.

Y de manera sumamente especial a mi esposa Karina Vázquez Rojas. Eres increíble, gracias a ti pude encontrar la paz interior que por tanto tiempo estuve buscando. No quiero alargarme tanto, solamente te quiero agradecer el siempre estar conmigo, apoyarme incondicionalmente, consentirme, hablar, reír, llorar; en fin, por ser parte de esta maravillosa vida que ahora puedo ver con tanta claridad. Te amo.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Antibacterianos de uso común y sus limitaciones	4
2.2 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos vegetales	4
2.3. Métodos de extracción de compuestos con actividad biológica	6
2.4. Métodos para el fraccionamiento y caracterización de compuestos	6
2.4.1 Cromatografía en capa fina	7
2.4.2 Cromatografía en columna	7
2.4.3 Espectrometría de masas	8
2.5 Bacterias infecciosas de mayor importancia en México	8
2.6 Ensayos de toxicidad en modelo de camarón salino (<i>Artemia salina</i>)	9
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPOTESIS	10
5. OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos particulares	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS	12
6.1 Selección de organismos con posible actividad antimicrobiana	12
6.2. Preparación de extractos	14
6.3. Preparación de discos	14
6.4. Características de las cepas	14
6.4.1 Preparación de cultivo bacteriano	15

6.4.2 Determinación de resistencia mediante Antibiograma.....	15
6.4.4 Identificación molecular.....	15
6.5. Método Kirby-Bauer de difusión en agar con disco.....	18
6.6. Fraccionamiento por solventes.....	18
6.7. Ensayo de termoestabilidad.....	20
6.8. Caracterización de extractos.....	21
6.9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	22
6.10. Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1.1 Antibiograma.....	24
7.1.2. Morfología colonial.....	26
7.1.3. Caracterización molecular.....	28
7.2. Ensayo de actividad antibacteriana por método de Kirby-Bauer.....	31
7.2.1. Actividad antibacteriana por unidades formadoras de colonia.....	34
7.3. Fraccionamiento por solventes.....	37
7.4. Pruebas de actividad antimicrobiana de fracciones.....	37
7.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	41
7.6. Ensayo de toxicidad en <i>A. salina</i>	43
7.7. Determinación de metabolitos secundarios por medio DIESI-MS.....	46
8. DISCUSIÓN.....	47
8.1. Acción antibacteriana de extractos crudos.....	47
8.2. Actividad antibacteriana de fracciones.....	49
8.3. Toxicidad de extractos en el modelo de <i>A. salina</i>	53
8.4. Determinación de metabolitos secundarios por espectrometría de masas de inyección directa por electrospray (DIESI-MS).....	55
9. CONCLUSIONES.....	57
10. LITERATURA CITADA.....	58
11. ANEXOS.....	67

Lista de figuras

- Figura 1:** Fraccionamiento líquido-líquido. a) Separación de la fase de CH₃OH-H₂O-hexano: la fase superior pertenece a la solución hexánica. b) Recuperación de la fase CH₃OH-H₂O la cual se reutilizó para la continuación del fraccionamiento. c) Separación de la solución CH₃OH-CH₂Cl₂; la fase inferior pertenece a la solución de CH₂Cl₂.....20
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se muestra la escalera (1Kb plus DNA ladder) en el carril 1; seguido de los productos de PCR. Carril 2: *S. aureus*; Carril 3: *L. monocytogenes*; carril 4: *E. coli*; carril 5: *A. baumannii*.; carril 6: *K. pneumoniae*; carril 7: *L. innocua*.....29
- Figura 3.** Inóculo bacteriano en cajas petri en donde se muestra la inhibición después del tratamiento de temperatura. Cada una de las filas muestra los tres tratamientos de temperatura de 65°, 80°, y 100°C, respectivamente. Fila 1: *S. aureus*; Fila 2: *L. monocytogenes*; Fila 3: *E. coli*.....35
- Figura 4.** Fracciones de CH₂Cl₂, y H₂O de mezquite, palo blanco (fracción acuosa y CH₂Cl₂) y garambullo.38
- Figura 5.** Ensayo de difusión en agar con discos impregnados con 1 mg de las fracciones de los extractos que mostraron actividad antibacteriana. En la fila 1: *S. aureus*; fila 2: *L. monocytogenes*; fila 3: *E. coli*. Extracto 2: *P. articulata*, 10: *L. candida*, 22: *L. schottii*, 25: *Euphorbia sp.*, Fracciones. Hex: Hexano; H₂O: Acuosa; AcE: Acetato de etilo; CH₂Cl₂: Diclorometano. (+): Control Positivo; (-): Control negativo39
- Figura 6.** Diámetro de inhibición, en mm, de las fracciones de los extractos que mostraron inhibición en pruebas antibacterianas a 10⁶ UFC/mL. En el eje de las abscisas: C= extracto sin fraccionar o concentrado; H= fracción de hexano; D= fracción de CH₂Cl₂; A= fracción de EtOAc; W= fracción de H₂O.....40
- Figura 7.** Concentración mínima inhibitoria de las fracciones que mostraron actividad antibacteriana en las pruebas de inhibición con fracciones. De izquierda a derecha. En *S. aureus*: 1) Ex2W, 2) Ex10W, 3) Ex22D, 4) Ex25A; en *L. monocytogenes*: 5) Ex2W; en *E. coli*: 6) Ex22W.41
- Figura 8.** Concentración mínima inhibitoria de la fracción acuosa del extracto de *Prosopis articulata* (Ex2W) en contra de *S. aureus*, y *L. monocytogenes*. Los datos presentados son los valores de las medias ± el error estándar a intervalos de confianza del 95%.42
- Figura 9.** Ensayo de Toxicidad con el modelo de *A. salina*. 1) Crecimiento de nauplios en pecera; 2) Nauplio II de *A. salina*; 3) Ensayo de toxicidad en microplaca de 96 pozos; 4) Pocillo de microplaca con nauplios II de *A. salina*.44

Figura 10. Análisis de dosis-respuesta probit en el cual se determinó la toxicidad, expresada en DL_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$), de los diferentes extractos y fracciones en el modelo de *A. salina*. Los datos presentados son los valores de las medias \pm el error estándar a intervalos de confianza del 95%. Los datos con la misma letra no son estadísticamente diferentes a $P < 0.05$. Ex2W, y Ex22C obtuvieron una $DL_{50} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que no se muestran en esta gráfica.45

Figura 11. Mapa de intensidades m/z que agrupó los iones más intensos del experimento incluyendo iones positivos y negativos de cada uno de los extractos y sus respectivas fracciones. El color negro representa los iones más intensos, y el blanco los menos intensos. Los iones representativos de los extractos y fracciones de: a) *P. articulata*; b) *L. candida*; c) *L. schottii*; d) *Euphorbia sp.*46

Lista de tablas

Tabla I. Antecedentes de actividad antimicrobiana de extractos de plantas.	5
Tabla II. Listado de extractos de plantas	13
Tabla III. Genes, primers, temperatura de alineamiento, y tamaño esperado de amplificación de las especies bacterianas	17
Tabla IV. Mezcla de reacción para PCR.	17
Tabla V. Resistencia a antibióticos por cepa. En la tabla se muestran los antibióticos utilizados en el antibiograma para cada cepa, la concentración mínima inhibitoria (CMI) en microgramos, y la interpretación (Int.) para cada una: Resistente (R), Intermedia (I), o Susceptible (S).....	25
Tabla VI. Morfología colonial de los cultivos de las diferentes cepas de esta investigación.	27
Tabla VII. Concentración de ADN extraído para caracterización molecular.	28
Tabla VIII. Resultados de secuenciación.....	30
Tabla IX. Diámetro de inhibición (mm) de los extractos de plantas en contra de las diferentes cepas.....	32
Tabla X. Diámetro de inhibición (mm) de discos con 1 mg de extracto en contra de bacterias a 10^6 UFC/mL. Como control positivo se utilizaron con Ampicilina a 10 μ g para <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> , y discos con Cloranfenicol a 30 μ g para <i>E. coli</i>	34
Tabla XI. Termoestabilidad de extractos a temperaturas de 60°C, 80°C, y 100°C. en contra de cepas a 10^6 UFC/mL. Como control positivo: Ampicilina a 10 μ g para <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> , y Cloranfenicol a 30 μ g para <i>E. coli</i>	36

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Entre ellos tenemos algunos péptidos antimicrobianos y metabolitos secundarios que presentan diversas propiedades, entre las cuales destacan las medicinales (Ávalos y Pérez Urria, 2009). Los péptidos antimicrobianos son utilizados por las plantas como un sistema de defensa que las protege contra una amplia gama de microorganismos como las bacterias y hongos. Dichos activos se han aislado de raíces, tallos, hojas, flores y semillas (Montesinos, 2007). Los metabolitos secundarios se clasifican acorde a sus respectivas vías biosintéticas, las cuales se clasifican en tres grandes grupos de moléculas: Alcaloides, compuestos fenólicos, y terpenos. Los compuestos fenólicos o polifenoles son productos secundarios que derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina, así como los flavonoides (Ávalos y Pérez Urria, 2009). Los alcaloides, son una familia de metabolitos secundarios con características fisicoquímicas particulares: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y presentan regularmente alguna actividad biológica. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares. Son compuestos químicos que poseen un nitrógeno heterocíclico procedente principalmente del metabolismo de los aminoácidos lisina, tirosina y triptófano (Ávalos y Pérez Urria, 2009). Los terpenos también llamados isoprenoides, constituyen el grupo más numeroso de los metabolitos secundarios, alrededor del 90% de la estructura de los aceites esenciales está formada por terpenos. El grupo de los terpenos incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides, derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos, saponinas), latex y aceites esenciales. Algunos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimicrobianas, entre otras (Ávalos y Pérez Urria,

2009). La búsqueda de nuevos antimicrobianos en extractos de plantas se ha planteado como una alternativa para tener nuevos fármacos contra microorganismos que afectan la salud humana. Entre las principales afecciones recurrentes en la salud se encuentran las Infecciones, de las más importantes, las Asociadas a la Atención de la Salud, las cuales aparecen durante el ingreso hospitalario (Olaechea, 2009). Las infecciones mencionadas anteriormente se dan principalmente por bacterias patógenas humanas, que, en lista propuesta por el Instituto Mexicano del Seguro Social, se da prioridad a cepas de las especies: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (IMSS, 2014). Dichas infecciones cuentan con diversos tratamientos en base a antibióticos comerciales entre los que se incluyen: aminoglucósidos y cefalosporinas, para infecciones por *P. aeruginosa*, y la penicilina y el ciprofloxacino para el caso de infecciones por *S. aureus* (IMSS, 2014). En el caso particular de *A. baumannii* se utilizan antibióticos de última generación y amplio espectro llamados carbapenemos, los cuales han mostrado ser significativamente más resistentes a la acción de las β -lactamasas producidas por algunas cepas multidrogoresistentes (Eliopoulos, *et al.* 2008). Sin embargo, algunas cepas bacterianas adquieren resistencia a los antibióticos más utilizados en el sector salud para el tratamiento de infecciones, confiriéndoles el título de bacterias drogoresistentes o en caso de ser resistentes a más de un antibiótico, multidrogoresistentes (WHO, 2015). Un organismo multidrogoresistente, según el criterio de Magiorakos *et al.* (2011), es un organismo resistente a uno o más agentes antibióticos en tres o más categorías de familias de antibióticos. La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen y mutan o se intercambian características de resistencia. Otro factor importante que acelera su aparición es la utilización y el uso indebido de antimicrobianos, así como las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, y las malas condiciones sanitarias (WHO, 2015). Según Paredes y Roca (2004), y Moreno y Beltrán (2009), los mecanismos de resistencia a antimicrobianos se pueden expresar de distintas maneras. Pueden ser por bombas de

eflujo, las cuales son proteínas transmembranales afines a algunos compuestos como los macrólidos, los cuales son detectados por dicha proteína y expulsados sin cambiar su composición química. Otras son las enzimas alteradoras que modifican a algunos antibióticos acetilando o adenilándolos, perdiendo así su funcionalidad. También se pueden presentar enzimas hidrolíticas como las beta-lactamasas las cuales hidrolizan el anillo β -lactámico de antibióticos como la penicilina o las cefalosporinas. Y por último tenemos la modificación del sitio blanco, la cual es solamente la modificación de una o más bases en un gen, evitando así la unión del antibiótico a dicho gen.

Teniendo en mente este panorama, es crítico desarrollar nuevas armas para el combate en contra de bacterias resistentes, el cual se base en el descubrimiento de potenciales fármacos en lugar modificaciones de antibióticos ya conocidos, que, sin lugar a duda a este paso, terminarán siendo obsoletos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Antibacterianos de uso común y sus limitaciones

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929, y el uso terapéutico de dicho antibacteriano, implementado en las épocas de la segunda guerra mundial (Chain *et al.*, 1940), pasando por las cefalosporinas, macrólidos, quinolonas y lipopéptidos, el hallazgo de antibióticos ha ido en declive desde 1975, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana es una gran prioridad (Nothias *et al.*, 2016). Los metabolitos secundarios de plantas resultan ser una gran opción para el descubrimiento de potenciales antimicrobianos (Abreu *et al.*, 2017).

2.2 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos vegetales

Entre los solventes orgánicos más utilizados para extracción se encuentra el etanol, el cual muestra una amplia afinidad de selección de compuestos polares y semipolares, además de ser un solvente un bajo punto de ebullición que ayuda a su rápida evaporación. La actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de plantas utilizando etanol se han estudiado ampliamente, teniendo como resultados los mencionados en la tabla I.

Aunque no existen registros de extractos de plantas de Baja California Sur utilizados contra de cepas como *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii*, para esta investigación se utilizarán como referencia los antecedentes antes mencionados para la selección de plantas con posible actividad antibacteriana que estén presentes en Baja California Sur. En caso de que la distribución natural de las especies de plantas con potencial actividad antibacteriana no se localice en la región de Baja California Sur, se colectarán plantas del mismo género y familia.

Tabla I. Antecedentes de actividad antimicrobiana de extractos de plantas.

Nombre científico	Ubicación	Actividad antibacteriana contra:	Referencia
<i>Lantana camara</i>	Sudamérica y América central	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Streptococcus faecalis</i>	Encarnación y Keer, 1991
<i>Parinari sprucei</i>	Selva amazónica, Venezuela	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Carvajal et al., 2013
<i>Haplopappus sonorensis</i>	BCS, México	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Encarnación, 2005
<i>Quercus devia</i>	BCS, México	<i>Staphylococcus aureus</i>	Encarnación, 1998
<i>Aristolochia monticola</i>	BCS, México	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>	Murillo, 2001
<i>Asclepias subulata</i>	BCS, México	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Murillo, 2003
<i>Asclepias curassavica</i>	Rangenhalli, Chikamagalore, India	<i>Pseudomonas solanacearum</i> , <i>Escherichia coli</i>	Hemavani y Thippeswamy, 2012
<i>Aloe barbadensis</i>	Regiones subtropicales de México	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> patógenas humanas	Pandey et al., 2010
<i>Lepechinia hastata</i>	BCS, México	<i>Staphylococcus aureus</i>	Encarnación, 1991
<i>Jatropha curcas</i>	Benin, Nigeria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Igbinosa, 2009
<i>Bursera simaruba</i>	Puebla, México	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA No. 3208 y No. 80401	Yasunaka, 2005
<i>Cyrtocarpa procera</i>	Puebla, México	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398 y ATCC 29213	Martínez, 2015
<i>Solanum sp.</i>	BCS, México	<i>Staphylococcus aureus</i>	Encarnación, 2005
<i>Hindsiamum ocimumbasilicum</i>	La Habana, Cuba	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rojas et al., 2012

2.3. Métodos de extracción de compuestos con actividad biológica

Existe una gran diversidad de métodos de extracción de compuestos con algún tipo de actividad biológica, como el explicado por Sasidharan *et al.* (2011) en el que, primeramente, las operaciones básicas incluyen el lavado del material vegetal, el secado con calor o por congelación. La molienda del producto para obtener una muestra homogénea, la cual también ayuda a aumentar el contacto de esta con el sistema de solventes a utilizar. Cabe destacar que Sasidharan *et al.* (2011) menciona que la planta a estudiarse se debe tratar dependiendo de los compuestos blanco, o en dado caso de que la planta ya sea utilizada en remedios tradicionales, apegarse lo más que se pueda a la metodología empleada por los expertos en medicina tradicional.

La extracción por solventes orgánicos consiste en utilizar solventes de diferente polaridad, que van desde los no polares, como el hexano, hasta los más polares, como el etanol, metanol o agua (Sasidharan *et al.*, 2011). Siendo el etanol uno de los solventes idóneos para la extracción de una gran gama de compuestos que van desde los taninos, polifenoles, flavonoides, terpenoides, esteroides, hasta alcaloides (Cowan, 1999).

2.4. Métodos para el fraccionamiento y caracterización de compuestos

Son muy variados, uno de los más rápidos y sencillos es el fraccionamiento por solventes de diferentes polaridades. En este método se utilizan lavados al material vegetal utilizando extracciones sucesivas con diferentes solventes, para así obtener extractos crudos con compuestos de diferente polaridad (Encarnación *et al.*, 2006). Dicho método ha llevado a la identificación de las fracciones de la especie vegetal *Calliandra californica*, la cual mostró una actividad antimicrobiana en contra de una cepa de *Staphylococcus aureus* (Encarnación *et al.*, 2006). Este método cuenta con variantes las cuales se han utilizado para el fraccionamiento de compuestos con actividad anticancerígena (Pettit 2012). En la variante del método descrita por Pettit *et al.* (2012) se realiza una mezcla de los solventes en un embudo de decantación, se agita, posteriormente, al separarse por su inmiscibilidad, se decanta la fracción inferior logrando así tener un extracto con una

polaridad determinada. Este método se puede complementar con técnicas más selectivas como la cromatografía en columna o la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) para así obtener compuestos puros.

Las técnicas de cromatografía consisten básicamente en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Existen varios tipos de métodos de determinación de compuestos, entre ellos:

2.4.1 Cromatografía en capa fina

En la cromatografía en capa fina se utiliza una placa recubierta con el adsorbente, denominado fase estacionaria, adherida sobre un soporte rígido, que puede ser una placa de vidrio, aluminio o poliéster. El eluyente, denominado fase móvil, ascenderá por capilaridad por la placa y acarreará los componentes en forma diferenciada a lo largo de ésta, produciendo “manchas” de los componentes. La elución de las sustancias dependerá tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado.

La cromatografía en capa fina nos permite determinar el grado de pureza de un compuesto y comparar muestras, entre otras cosas.

2.4.2 Cromatografía en columna

La cual es el paso de una muestra por una columna de adsorbente (en la mayoría de los casos gel de sílice), al cual se le conoce como fase estacionaria, y al cual se le agrega un eluyente (fase móvil). Los compuestos con mayor afinidad al adsorbente migrarán por la columna a menor velocidad que los compuestos con menor afinidad, separándolos por su polaridad, para al final obtener fracciones de diferentes naturalezas polares.

La principal ventaja de estos métodos es la separación selectiva y la purificación de una solución que contiene un gran número de moléculas diversas. Este método es uno de los más utilizados para elucidar moléculas de valor farmacéutico, como lo mostrado por

Encarnación *et al.* (2005), investigación en la cual se realizó una separación de compuestos por cromatografía en columna para obtener fracciones con actividad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* ATCC25922.

2.4.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su relación masa-carga. Si se combina la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas el resultado es una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad.

Las técnicas mencionadas han resultado muy eficaces para el fraccionamiento, determinación y caracterización de los compuestos presentes en una solución, y en el caso de la fitoquímica, herramientas sumamente efectivas para la caracterización de compuestos provenientes de extractos vegetales.

2.5 Bacterias infecciosas de mayor importancia en México

Según los datos proporcionados por Arias *et al.* (2016) existen un gran número de especies de bacterias patógenas. Entre los grupos de mayor importancia, los cuales generan mayor resistencia a antimicrobianos, y se presentan en mayor proporción en los hospitales, se encuentra el grupo denominado ESKAPE, denominado así por la letra inicial de cada una de las especies que conforman dicho grupo; entre las cuales se tienen: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. En Estados Unidos se reporta que los microorganismos aislados de pacientes con infecciones asociadas a la atención de la salud con mayor incidencia en nosocomios son: *Staphylococcus aureus* (15.6%), *Escherichia coli* (11.5%), *Klebsiella pneumoniae* (8%), *Acinetobacter baumannii* (1.8%), entre otros (Sievert *et al.* 2013).

Arias *et al.* (2016), mencionan que en México la Secretaría de Salud identifica a los principales agentes patógenos en las infecciones anteriormente mencionadas como

Staphylococcus aureus (13%), *Acinetobacter baumannii* (7%), *Enterococcus spp.* (6%), y *Candida spp.* (5%), sin embargo, los resultados obtenidos en su investigación en colaboración con el IMSS indican que las cepas bacterianas más frecuentemente aisladas fueron: *Escherichia coli* (16.9%), *Staphylococcus aureus* (9.8%), *Klebsiella pneumoniae* (6.5%), *Acinetobacter spp.* (3.0%), entre otros.

Los tratamientos para dichos patógenos han resultado ser menos efectivos debido a la resistencia que se ha ido presentando en los últimos años.

2.6 Ensayos de toxicidad en modelo de camarón salino (*Artemia salina*)

El ensayo de letalidad en *A. salina*, propuesto inicialmente por Meyer *et al.* (1982) se ha utilizado como escrutinio inicial en numerosos estudios para probar la toxicidad de productos naturales aislados de plantas, debido a que muestra la ventaja de resultados dentro de 24 h, de bajo costo, y con consideraciones simples de esterilidad. El ensayo consiste eclosionar quistes de *A. salina* hasta su etapa de nauplio I o II, y así probar los compuestos en busca de toxicidad, para posteriormente realizar un análisis de DL₅₀ (Rajeh *et al.*, 2010).

Investigaciones como la de Apu *et al.* (2010) demostraron que las fracciones de n-hexano y cloroformo del extracto etanólico de *Dillenia indica* mostraron toxicidad en el modelo del camarón salino a concentraciones de 1.94 µg/mL y 2.13 µg/mL, respectivamente, teniendo una toxicidad alta tomando como referencia la toxicidad del sulfato de vincristina (0.5 µg/ml), un potente anticancerígeno utilizado para el tratamiento de leucemia infantil (Karon *et al.*, 1962).

3. JUSTIFICACIÓN

En México se cuenta con alrededor de 25,000 especies de plantas vasculares (Rzedowski 1998) de las cuales 2700 se encuentran en Baja California Sur (Murillo, 2003) de las cuales alrededor de 369 especies se consideran medicinales (Encarnación, 1996). Una de las grandes exponentes de la Bioprospección es la investigación realizada por YouYou Tu, ganadora del premio nobel de fisiología o medicina, por el descubrimiento de la Artemisinina, basándose en la exploración de textos de la medicina tradicional china (Tu, 2011). Por este y muchos otros trabajos, los investigadores han enfocado su atención a la medicina tradicional, en especial a las plantas, con el afán de descubrir nuevos compuestos bioactivos (Tu, 2011). En B.C.S. Se cuenta con un gran número de investigaciones las cuales puntualizan la actividad antimicrobiana, en contra de bacterias como *E. coli*, *S. aureus*, y *Candida albicans*. (Encarnación *et al.*, 1998), entre otras, de los extractos de las especies endémicas y de distribución natural de la región. Por esta razón, el aprovechamiento de dichos recursos para la obtención de bioactivos es de suma importancia.

4. HIPOTESIS

Si los extractos de las especies de plantas utilizadas en esta investigación presentan actividad antibacteriana contra: *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. innocua* ATCC 33090, *K. pneumoniae pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 29213 y *A. baumannii* complex, entonces será posible identificar fracciones de los extractos con metabolitos secundarios con potencial farmacológico por su actividad después de tratamiento térmico y su baja o nula toxicidad en ensayos con *Artemia salina*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Seleccionar fracciones de extractos con metabolitos secundarios de plantas de B.C.S. con actividad antibacteriana contra *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. innocua* ATCC 33090, *K. pneumoniae pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 29213 y *A. baumannii* complex, y evaluar su potencial farmacológico.

5.2 Objetivos particulares

Determinar la actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria de los extractos de plantas en las cepas: *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. innocua* ATCC 33090, *K. pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 29213 y *A. baumannii* complex.

Evaluar la termoestabilidad y toxicidad de los extractos utilizando el modelo de *Artemia salina*.

Caracterizar los perfiles iónicos de las fracciones con metabolitos secundarios que presentan actividad antibacteriana contra *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. innocua* ATCC 33090, *K. pneumoniae pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 29213 y *A. baumannii* complex y seleccionar aquellos con potencial farmacológico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Selección de organismos con posible actividad antimicrobiana

Los extractos fueron proporcionados por el Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Autónoma de Baja California Sur y se encuentran enlistados en la tabla II, Cada una de las plantas utilizadas para la creación de los extractos fueron perfectamente identificadas por el M.C. Jorge Agundez del laboratorio del laboratorio fanerogámico, de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Tabla II. Listado de extractos de plantas

Nombre común	Nombre científico	Código	Parte utilizada
Mezquite	<i>Prosopis articulata</i> , S. Wats	PAUABCS001-Fr1	Tallo
Mezquite	<i>Prosopis articulata</i> , S. Wats	PAUABCS001-Fr2	Hojas
Hierba del manso	<i>Anemopsis californica</i> (Nutt.) Hook & Am.	PAUABCS002-Fr1	Raíz
Hierba del manso	<i>Anemopsis californica</i> (Nutt.) Hook & Am.	PAUABCS002-Fr2	Hojas
Pitahaya dulce	<i>Stenocereus thurberi</i>	PAUABCS004-Fr1	Tallo
Pitahaya agria	<i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm) Gibson & Acvak	PAUABCS003-Fr2	Pulpa de fruto
Pitahaya agria	<i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm) Gibson & Acvak	PAUABCS003-Fr3	Pulpa de fruto
Pitahaya agria	<i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm) Gibson & Acvak	PAUABCS003-Fr4	Cáscara de fruto
Pitahaya agria	<i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm) Gibson & Acvak	PAUABCS003-Fr1	Tallo
Palo blanco	<i>Lysiloma candida</i> , Brandegee	PAUABCS005-Fr1	Tallo
Palo blanco	<i>Lysiloma candida</i> , Brandegee	PAUABCS005-Fr2	Hojas
Cardón, cardón pelón	<i>Pachycereus pringlei</i> (S. Wats) Britt & Rose	PAUABCS006-Fr1	Tallo
Copalquin	<i>Bursera filicifolia</i> , Brandegee	PAUABCS007-Fr1	Tallo
Malva, hierba del cáncer	<i>Walteria</i> sp.	PAUABCS008-Fr1	Completa
Lomboy blanco	<i>Jatropha cinérea</i> (C.G. Ortega) Muell- Arg. Ing. DC.	PAUABCS009-Fr1	Tallo
Palo fierro, Ejotón	<i>Pithecellobium confine</i> , Stanley	PAUABCS010-Fr1	Tallo
Palo fierro, Ejotón	<i>Pithecellobium confine</i> , Stanley	PAUABCS010-Fr2	Hojas
Guatamote, Huatamote	<i>Baccharis sarathroides</i> , A. Gray; <i>Baccharis glutinosa</i> , Pers.	PAUABCS011-Fr1	Tallo
Guatamote, Huatamote	<i>Baccharis sarathroides</i> , A. Gray; <i>Baccharis glutinosa</i> , Pers.	PAUABCS011-Fr2	Hojas
Palo Adán	<i>Fouquieria diguetii</i> (Van Tieghem) I.M. Jhonston	PAUABCS012-Fr1	Tallo
Hierba del pasmo	<i>Haplopappus sonorensis</i> (A. Grey) S.F. Blake	PAUABCS013-Fr1	Completa
Garambullo	<i>Lophocereus schotii</i> (Engelm) Britt & Rose	PAUABCS014-Fr1	Tallo
Colorín	<i>Erythrina americana</i>	PAUABCS015-Fr1	Corteza
Candelilla	<i>Pedilanthus macrocarpus</i>	PAUABCS016-Fr1	Tallo
Golondrina	<i>Euphorbia</i> sp.	PAUABCS018-Fr1	Completa
Torote blanco	<i>Bursera odorata</i> , Brandegee	PAUABCS017-Fr1	Completa (Hexano)
Torote blanco	<i>Bursera odorata</i> , Brandegee	PAUABCS017-Fr3	Completa (Acetato de etilo)
Torote blanco	<i>Bursera odorata</i> , Brandegee	PAUABCS017-Fr5	Completa (Acuosa)

6.2. Preparación de extractos

Los extractos se prepararon sumergiendo la planta macerada en etanol al 96%, por un lapso de una semana. Se filtró el contenido en frascos utilizando un embudo y papel filtro de celulosa Whatman® grado 1 de 25mm. El extracto resultante fue concentrado a sequedad a presión reducida a 40 °C (± 2 °C) en rotavapor Yamato RE500.

6.3. Preparación de discos

Se pesaron 10 mg de extracto crudo en balanza analítica (Mettler Toledo AG245), y se diluyó 4:1 en una solución de etanol-agua para obtener un volumen final de 100 μ L, obteniendo una concentración de 100 mg/mL. Dentro de una campana de flujo laminar, se impregnaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro agregando 10 μ L, de la alícuota anteriormente descrita, para obtener discos a concentraciones de 1 mg/disco. Se permitió la evaporación del solvente a temperatura ambiente, y posteriormente se colocaron en tubos estériles para su uso. Así mismo, como control negativo se prepararon discos con la solución de 4:1 de etanol-agua para redissolver los extractos, y cloranfenicol a 30 μ g/mL, ampicilina a 10 μ g/mL y gentamicina a 4 y 1 μ g/mL como controles positivos.

6.4. Características de las cepas

Seis cepas fueron otorgadas por parte de la M.C. Carolina Garciglia Mercado del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste: *Escherichia coli* O157:H7 aislada de alimentos, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Listeria innocua* ATCC 33090. aislada de alimentos, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* complex aisladas de pacientes en unidades médicas, esta última de carácter multidrogoresistente.

6.4.1 Preparación de cultivo bacteriano

La reactivación de las cepas otorgadas por el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. se llevó a cabo preparando un medio líquido nutritivo Difco™ LB-Broth en el cual se inoculó una asada del cultivo bacteriano. Se permitió el crecimiento por 24h a 35° C (± 1 °C) en incubadora con agitación orbital.

6.4.2 Determinación de resistencia mediante Antibiograma.

Para determinar la resistencia a antimicrobianos de cada una de las cepas, los cultivos se enviaron a laboratorios clínicos. Los resultados de los antibiogramas se detallan en la sección de Resultados.

6.4.3 Identificación por morfología colonial

Para corroborar la identificación de las cepas bacterianas se prepararon cultivos con medio Difco™ LB-Broth líquido, se inocularon y se cultivaron a 35°C durante 24h en incubadora con agitación orbital, después de lo cual se tomaron 100 μ L para inocular en placas por el método de extensión con ayuda de un asa de vidrio. Se permitió el crecimiento por 24h a 35° C (± 1 °C) para posteriormente analizar la morfología colonial de cada una de las especies bacterianas con ayuda de un estereoscopio.

6.4.4 Identificación molecular

Con intención de corroborar las especies bacterianas a trabajar se complementa dicha identificación con un análisis de ADN bacteriano, para el cual se obtuvo el ADN utilizando el método de fenol-cloroformo. Se obtuvo un cultivo bacteriano en medio nutritivo LB líquido. Ya mostrado el crecimiento se pasó el medio con células a tubos eppendorf de 2

mL, y se centrifugó a $18,828 \times g$ por 10 minutos, se decantó el medio, y se obtuvo un pellet de células. Se agregaron 500 μL de Buffer de lisis (Tritón 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris HCL 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) junto con 30 mg de perlas de vidrio, y se procedió a lisar por medio de FastPrep. Posteriormente se agregaron 4 μL de proteinasa K y se mezcló por inversión. La muestra se incubó a 37°C por 24h. Cumplido el tiempo de incubación se agregaron 100 μL de NaCl 5M y se mezcló suavemente por inversión. Se agregaron 500 μL de fenol-cloroformo para separar el ADN de otros componentes celulares. Se mezcló suavemente por inversión, y posteriormente se centrifugó el material a $18,828 \times g$ por 10 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo al cual se le agregaron 10 μL de acetato de amonio 5M. Se mezcló suavemente por inversión. Se agregaron 700 μL de isopropanol y se agitó suavemente para ayudar a la precipitación. Nuevamente se centrifugó el material a $18,828 \times g$ por 10 minutos, se obtuvo un pellet con ADN. Se decantó el sobrenadante cuidando que el pellet se encontrara fijo en el tubo. Se agregaron 500 μL de alcohol etílico 70% y se agitó suavemente para ayudar a limpiar el pellet de ADN, se procedió a volatilizar el alcohol. Se agregó un volumen de 100 μL de agua MiliQ para resolubilizar el pellet, y para finalizar se agregaron 4 μL de RNAsa (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para ayudar a degradar cualquier RNA que pudiera contaminar la muestra. Se incubó a 37°C por una hora.

El ADN obtenido de la extracción fue cuantificado con un nanodrop. Posteriormente se crearon diluciones para crear stocks a una concentración de ADN de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Seguidamente se procedió a amplificar utilizando el método de PCR con la mezcla de reacción descrita en la tabla IV, y con los primers mencionados en la tabla III. Las condiciones del termociclador fueron 5 min. 95°C , 30s 95°C , 30S tm (Tabla III), 30s 72°C , 34 ciclos, y 5 min 72°C . En la tabla III se muestran las características de los genes, primers y temperaturas de alineamiento utilizadas por cepa. Se preparó un gel de Agarosa al 1% utilizando buffer TAE 1X, al solidificar el gel se procedió a cargar cada uno de los pocillos con 10 μL de producto de PCR y se permitió la migración por 50 minutos con carga de 100V.

Tabla III. Genes, primers, temperatura de alineamiento, y tamaño esperado de amplificación de las especies bacterianas

Cepa	Primer	Tm	Gen	Tamaño (pb)	Referencia
<i>E. coli</i> 0157:H7	Ae19	58°C	eaeA	1087	Fratamico <i>et al.</i> , 1995
<i>L. monocytogenes</i>	Lmo2234	55°C	lmo2234	420	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>L. innocua</i>	pA	55°C	16s	1500	Schwieger <i>et al.</i> , 1998
<i>S. aureus</i>	Sau1	55°C	<i>S. aureus</i> specific sequence	107	Strommenger <i>et al.</i> , 2003
<i>K. pneumoniae</i>	Mdh-F	52°C	mdh	364	Thong <i>et al.</i> , 2011
<i>A. baumannii</i>	OXA-51-likeF	57°C	blaOXA-51-like	353	Turton <i>et al.</i> , 2006

Tabla IV. Mezcla de reacción para PCR.

Reactivo	Concentracion	Volumen μl
H ₂ O MQ	Volumen final 25 μ L	17.94
Buffer GoTaq	5x	2.5
MgCl ₂	25 mM	1.5
dNTP's	10 mM	1
Primers	10 μ m	1
Taq	8 unidades/ μ L	0.06
Polimerasa		
Templado	100 ng/ μ L	1

6.5. Método Kirby-Bauer de difusión en agar con disco

El método por difusión en agar con disco es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013). Para el mencionado método se realizaron cultivos en medio Difco™ LB-Broth de las bacterias ya mencionadas y se permitió el crecimiento en incubadora por 24 h a 37°C. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del inóculo hasta tener una concentración aproximada de 10^6 UFC/mL.

Como tamizado inicial se aplicó el método Kirby-Bauer, conocido como el método de difusión en agar con disco. Este consta de la utilización de discos de papel filtro impregnados con el compuesto a probar. Dichos discos se colocaron en placas petri con medio Difco™ LB-agar previamente vertido y solidificado al cual se le adicionaron 100 μ L de medio previamente inoculado con las cepas bacterianas a trabajar. Agregado el inóculo se dispersó con ayuda de una varilla de vidrio. Se trasladaron las cajas petri inoculadas con los discos de papel filtro a una incubadora a 37°C de temperatura y se dejaron en reposo por 24 h para permitir el crecimiento bacteriano. Pasado el tiempo de reposo, se extrajeron las cajas de la incubadora y se procedió a la medición de los halos de inhibición (mm) con la ayuda de una regla.

6.6. Fraccionamiento por solventes

Ya seleccionados los extractos con actividad antimicrobiana se realizó un fraccionamiento de estos utilizando el método de separación líquido-líquido. Se inició preparando 100 mL de una solución 9:1 de $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$, utilizando 90 ml de CH_3OH y 10 ml de H_2O destilada; dicha solución se agregó al concentrado (extracto) y se procedió a homogenizar con agitación manual; la solución final fue trasladada a un embudo de separación. Seguidamente se agregaron 100 mL de hexano y se procedió a mezclar la solución por agitación manual. Se permitió la separación de fases por polaridad e inmiscibilidad de la solución (Fig. 1a). Observando la separación de fases se propuso a decantar la fase

inferior, que en este caso pertenecía a la solución $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$, y se aseguró para su posterior uso (Fig. 1b). La fase restante se recuperó en un matraz bola (matraz redondo de recolección). Dicha fase se concentró, primeramente, deshaciéndonos del H_2O con ayuda de Na_2SO_4 anhidro y posteriormente utilizando un rotavapor. La fase recuperada de $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ se reintrodujo y se repitió el procedimiento de separación tres veces más para obtener así cuatro volúmenes de la fracción de hexano. Al término de este fraccionamiento se recuperó nuevamente la solución $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$, a la cual se le agregaron 50 mL de H_2O destilada, y 100 mL de CH_2Cl_2 , y se vertió en un embudo de separación; se agitó y se procedió a separar la fase de CH_2Cl_2 (Fig. 1c) y concentrar utilizando proceso anteriormente descrito. La última parte del fraccionamiento se realizó evaporando el CH_3OH de la solución $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ recuperada del proceso posterior. A la fase acuosa del extracto se le agregaron 50 mL de EtOAc ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) y se realizó la mezcla y separación pertinente. Al final se obtuvieron las fracciones de hexano, CH_2Cl_2 , EtOAc, y H_2O .

6.7. Ensayo de termoestabilidad

Para medir la termoestabilidad de los extractos, se procedió a pesar en tres tubos eppendorf de 2 mL, 10 mg de cada uno de los extractos que presentaron actividad. Los extractos se calentaron por un lapso de 1 hora en termoblock a temperatura de 65°C, 80°C, y 100°C. Posterior al tratamiento con temperatura se procedió a realizar una prueba antibacteriana por difusión en agar utilizando la metodología anteriormente descrita para el ensayo inicial de inhibición.



Figura 1: Fraccionamiento líquido-líquido. a) Separación de la fase de $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ -hexano: la fase superior pertenece a la solución hexánica. b) Recuperación de la fase $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ la cual se reutilizó para la continuación del fraccionamiento. c) Separación de la solución $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$; la fase inferior pertenece a la solución de CH_2Cl_2 .

6.8. Caracterización de extractos

La caracterización de los extractos se realizó por medio de Espectrometría de masas con inyección directa por electrospray (DIESI-MS) (García-Flores *et al.*, 2012, 2015, Beckmann *et al.*, 2008). Para dicha caracterización se pesaron 25 mg de extracto en tubos eppendorf y se agregó 1 mL de EtOH grado masas al 80% a cada uno de los tubos. Posteriormente se sonicó la muestra por 20 min para ayudar a la disolución. Ya disuelta la muestra en el solvente se centrifugó por 15 min a $28672 \times g$ a 4°C de temperatura. Al obtener el material centrifugado, el sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo, y se realizaron diluciones a 1:100 (10 μL de muestra, 990 μL de MEtOH grado masas al 80%). Por último, se filtraron las muestras utilizando filtros de 0.2 μm para evitar cualquier contaminación por partículas no disueltas y así prevenir la posible saturación del capilar. Las muestras diluidas fueron analizadas por DIESI-MS en modo positivo y negativo, el empleo de un Micromass ZQ 2000 y un SQD2 con un analizador de cuadrupolo (Waters) y MassLynx 4.0 como software (García-Flores *et al.*, 2012). Los experimentos de control se llevaron a cabo para determinar los parámetros de tratamiento de la muestra. Con la ayuda de una bomba de jeringa cargada con 100 μL fueron introducidas las muestras al equipo con una tasa de flujo constante de 600 $\mu\text{L}/\text{h}$. Para las condiciones del equipo se dispuso la tensión capilar a 3 kV; el voltaje de cono se fijó a 30 V; la tensión de extractor se fijó a 3 V; y la frecuencia de radio (RF) de la lente se dejó a 2.5 V. La temperatura de la fuente (100°C) y la temperatura de desolvatación 150°C . Se utilizó un flujo de gas de nitrógeno de 250 L/h y un flujo de gas de cono de 50 L/h.

Las lecturas de los iones de cada fracción de los extractos se analizaron con la ayuda de lenguaje de programación R (versión 3.2.4). Primero se importó la base de datos con los iones de la muestra, la información se acomodó en formato de matriz para generar un espectro general para ubicar picos de ionización, esto último utilizando la librería *ChemometricsWithR* (Wehrens, 2011). Se realizó un análisis estadístico de varianza para evaluar si hubo diferencia significativa entre la media de la intensidad de los iones entre

las fracciones de cada extracto, los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la librería *agricolae* (De Mendiburu, 2009). Se seleccionó el conjunto de iones más representativos de cada fracción y se dispusieron en forma de *heatmaps* por extracto, con la finalidad de presentar visualmente los iones más intensos. Por último, se realizó un análisis de comparación pareada con una función de distancia para evaluar la similitud entre las fracciones y se graficó sobre el respectivo *heatmap*. Los valores se asignaron centrados y escalados en dirección de fila.

6.9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Para medir la concentración mínima inhibitoria se utilizó la microdilución en caldo, la cual consiste en preparar un medio de cultivo líquido el cual se inoculó con las bacterias y se mantuvo en reposo en incubadora por 24h a 37°C. Adicionalmente se prepararon 10 tubos eppendorf de 2 mL con 1 mL de medio de cultivo líquido que se utilizó para el crecimiento de las bacterias. Se preparó una solución madre del extracto vegetal a probar a una concentración de 1 mg/mL y se adicionó 1 mL de esta solución madre a un tubo eppendorf con 1 mL de medio de cultivo (concentración de 0.5 mg/mL). A partir de este tubo se prepararon diluciones seriadas transfiriendo 1 mL del primer tubo al segundo tubo (0.25 mg/mL), después de este tubo se pasó 1 mL al tercer tubo (0.125 mg/mL) y así sucesivamente hasta llegar al tubo 6 (0.015 mg/mL). Posteriormente se añadieron 100 µL del cultivo líquido con bacterias preparado con anterioridad a placas con medio Difco™ LB-agar y se dispersó con ayuda de una varilla de vidrio hasta absorberse completamente el inóculo en el medio de cultivo. Las diferentes concentraciones de extracto vegetal fueron adicionadas a discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, los cuales se dispusieron alrededor de la placa. Los halos de inhibición se midieron con ayuda de un calibrador vernier para así obtener el diámetro de actividad de cada una de las diluciones.

6.10. Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*

Con la intención de lograr un cultivo axénico, 500 mg de quistes de *A. salina*, marca Eclosión Azul, fueron pesados en balanza analítica, a los cuales se adicionaron 2 ml de NaClO (Cloralex®) y se dejó en reposo por tres minutos. Posteriormente se lavaron los quistes con agua destilada hasta deshacerse del NaClO. En una pecera se introdujeron los quistes de *A. salina* a eclosionar en 1 L y se adicionó una solución de agua salada (1 L agua destilada y 35 gr de sal de mar). Se mantuvo el cultivo a temperatura ambiente por 48 h con inyección de aire y una fuente de luz directa constante. Después de la incubación se colocó la fuente de luz en un extremo de la pecera para atraer a los nauplios y separarlos de los quistes aún sin eclosionar. Con ayuda de una micropipeta se tomaron 10 ejemplares de *A. salina* y se trasladaron a un pozo de placas de 96 pocillos junto con 200 μ L de volumen total de agua. Para la prueba de toxicidad en *A. salina* se probaron las concentraciones de 1000 μ g/mL, 800 μ g/mL, 600 μ g/mL, 400 μ g/mL, 200 μ g/mL, y 100 μ g/mL. Se agregaron 5 μ L de una solución de Dicromato de potasio al 1% como control positivo (Tavarez *et al.*, 2016) y 5 μ L de solución 4:1 de etanol-agua como control negativo. Se realizaron triplicados de cada uno de los extractos y se dejaron actuar por 24 h. Tras la acción del extracto se procedió a contabilizar las larvas totales, vivas y muertas. Se realizaron tres experimentos independientes del ensayo con *A. salina* para todas las fracciones. Los datos del conteo se introdujeron al programa Minitab®18, y se realizó un análisis de dosis-respuesta probit.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de las cepas

7.1.1 Antibiograma

Los resultados del antibiograma (Tabla V) muestran que *S. aureus* es resistente a los antibióticos Enoxacina y Gentamicina a 10µg; *L. monocytogenes* muestra resistencia a Enoxacina a 10 µg, y Netilmicina a 30 µg; *E. coli* a Ampicilina a 10 µg, y Gentamicina a 10 µg; *Listeria innocua* ATCC 33090. a Ceftriaxona y Eritromicina, *K. pneumoniae* sólo a Ampicilina a concentraciones mayores a 32 µg, y *A. baumannii* demostró resistencia a Ampicilina a concentraciones mayores a 32 µg, Ceftriaxona, Cefazolina, Cefepima, y Aztreonam a concentraciones mayores a 64 µg, Sulfametoxazol-Trimetroprim mayor a 320 µg, Meropenem a concentraciones mayores a 16 µg, Ciprofloxacino mayor a 4 µg, y Nitrofurantoína mayor a 512 µg. Con base al criterio descrito por Magiorakos *et al.* (2012) en donde menciona que una bacteria multidrogoresistente es aquella que no resulta inhibida por tres clases diferentes de antibióticos, *A. baumannii* resultó la única bacteria con esta característica, confiriéndole el título de multidrogoresistente.



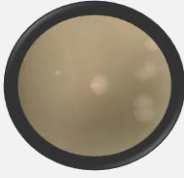



Tabla V. Resistencia a antibióticos por cepa. En la tabla se muestran los antibióticos utilizados en el antibiograma para cada cepa, la concentración mínima inhibitoria (CMI) en microgramos, y la interpretación (Int.) para cada una: Resistente (R), Intermedia (I), o Susceptible (S).

Antibiótico	Cepa											
	<i>E. coli</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>		<i>S. aureus</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>	
	CMI	Int.	CMI	Int.	CMI	Int.	CMI	Int.	CMI	Int.	CMI	Int.
Amikacina	30	S	30	S	30	S	30	S	<=2	S	32	I
Ampicilina	10	R	10	S	10	S	10	S	>=32	R	>=32	R
Cefalotina	30	S	30	S	30	S	30	S	-	-	-	-
Ceftriaxona	30	S	30	S	30	R	30	S	<=1	S	>=64	R
Cloranfenicol	30	S	30	S	30	S	30	S	-	-	-	-
Dicloxacilina	1	S	1	S	1	S	1	S	-	-	-	-
Enoxacina	10	S	10	R	10	S	10	R	-	-	-	-
Eritromicina	15	S	15	S	15	R	15	S	-	-	-	-
Gentamicina	10	R	10	S	10	S	10	R	<=1	S	4	S
Netilmicina	30	S	30	R	30	S	30	S	-	-	-	-
Penicilina	10U	S	10U	S	10U	S	10U	S	-	-	-	-
Sulfametoxazol-Trimetroprim	25	S	25	S	25	S	25	S	<=20	S	>=320	R
Ampicilina-Sulbactam	-	-	-	-	-	-	-	-	4	S	16	I
Cefazolina	-	-	-	-	-	-	-	-	<=4	S	>=64	R
Cefepima	-	-	-	-	-	-	-	-	<=1	S	>=64	R
Aztreonam	-	-	-	-	-	-	-	-	<=1	S	>=64	R
Ertapenem	-	-	-	-	-	-	-	-	<=0.5	S	-	-
Meropenem	-	-	-	-	-	-	-	-	<=0.25	S	>=16	R
Tobramicina	-	-	-	-	-	-	-	-	<=1	S	<=1	S
Ciprofloxacino	-	-	-	-	-	-	-	-	<=0.25	S	>=4	R
Tigeciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	<=0.5	S	2	S
Nitrofurantoína	-	-	-	-	-	-	-	-	64	I	>=512	R

7.1.2. Morfología colonial

Al observar a estereoscopio con una magnificación 20X, se pudieron analizar a detalle las características de la morfología colonial mostrada por cada una de las cepas (Tabla VI).

Tabla VI. Morfología colonial de los cultivos de las diferentes cepas de esta investigación.

Cepa	Imagen	Descripción
<i>E. coli</i> O157:H7		Blanquecinas, circulares, convexas, borde irregular
<i>S. aureus</i> ATCC 29213		Blanquecinas, circulares, bordes redondeados, convexas
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313		Blanquecinas, circulares, bordes redondeados, elevada
<i>L. innocua</i> ATCC 33090.		Blanquecinas, circulares, bordes redondeados, elevadas
<i>A. baumannii</i> complex		Blanquecinas, semicirculares, bordes semi-ondulados, convexa
<i>K. pneumoniae</i>		Blanquecina, bordes redondeados, convexas

7.1.3. Caracterización molecular

Con el propósito de corroborar la identidad de las especies con las que se están trabajando, se realizó la extracción de ADN detallada anteriormente en el apartado de metodología, obteniendo concentraciones desde 410 ng/ μ L hasta 3,556 ng/ μ L (Tabla VII). Los resultados de la relación 260/280 muestran el grado de pureza del DNA, siendo arriba de 2 el óptimo, según reportado en el manual del equipo NanoDrop. Sin embargo, es posible trabajar con purezas superiores a 1.5, lo cual se cumplió con las extracciones obtenidas en esta sección (Tabla VII).

Tabla VII. Concentración de ADN extraído para caracterización molecular.

Especie/cepa	Concentración	260/280
<i>S. aureus</i>	3556.2 ng/ μ L	1.95
<i>L. monocytogenes</i>	708.2 ng/ μ L	1.86
<i>E. coli</i>	410 ng/ μ L	1.66
<i>L. innocua</i>	674.2 ng/ μ L	1.91
<i>K. pneumoniae</i>	1375.2 ng/ μ L	2.01
<i>A. baumannii</i>	2920.5 ng/ μ L	1.88

Posteriormente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las regiones específicas para cada cepa. Como resultado se obtuvieron fragmentos de distintas longitudes (pb) amplificados por el juego de primers reportados en la tabla III. Los resultados de PCR se enviaron a secuenciar y se reportan sus amplicones, porcentaje de identidad, y número de acceso en la tabla VIII. Para observar estos fragmentos y corroborar su tamaño, fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% (Fig. 2).

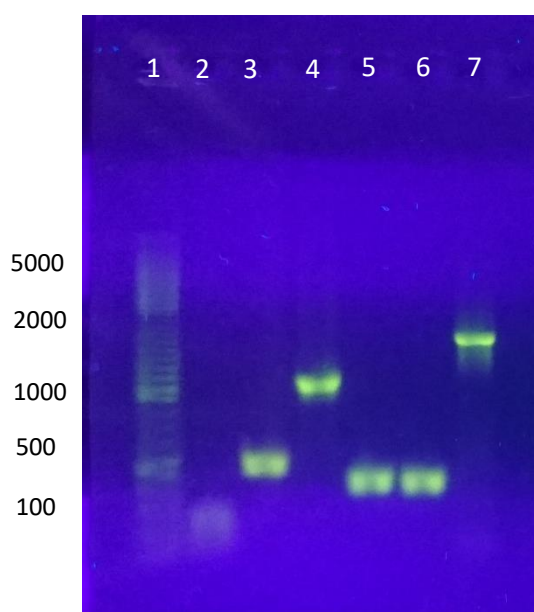


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se muestra la escalera (1Kb plus DNA ladder) en el carril 1; seguido de los productos de PCR. Carril 2: *S. aureus*; Carril 3: *L. monocytogenes*; carril 4: *E. coli*; carril 5: *A. baumannii*.; carril 6: *K. pneumoniae*; carril 7: *L. innocua*.

Tabla VIII. Resultados de secuenciación.

Especie	Longitud	BLAST	
		No. Acceso (NCBI)	Identidad (%)
<i>E. coli</i> 0157:H7	1154	CP015843.2	99
<i>L. monocytogenes</i>	387	HE999705.1	99
<i>L. innocua</i>	1353	NR_116805.1	95
<i>S. aureus</i>	75	CP027486.1	97
<i>K. pneumoniae</i>	334	CP028787.1	99
<i>A. baumannii</i>	325	JX305929.1	99

7.2. Ensayo de actividad antibacteriana por método de Kirby-Bauer

El screening inicial reveló que algunos de los extractos efectivamente mostraban actividad antibacteriana (Tabla IX). Siendo el de más amplia actividad el extracto de Garambullo, *L. schotti* cuya acción fue efectiva en ambas cepas gram positivas, de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, e incluso en la cepa gram negativa, *E. coli*. Sin embargo, los extractos de Mezquite *prosopis articulata*, y Golondrina, *Euphorbia sp.*, también presentaron inhibición, el primero de ellos tanto en *S. aureus* como en *L. monocytogenes*. Ningún extracto mostró actividad en *L. innocua*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*.

Tabla IX. Diámetro de inhibición (mm) de los extractos de plantas en contra de las diferentes cepas.

Extracto	Código	Especie.	Parte	Microorganismo					
				<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
#									
1	Ex1	<i>P. articulata</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
2	Ex2	<i>P. articulata</i>	Hoja	15	11	0	0	0	0
3	Ex3	<i>A. californica</i>	Raíz	0	0	0	0	0	0
4	Ex4	<i>A. californica</i>	Hoja	0	0	0	0	0	0
5	Ex5	<i>S. gummosus</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
6	Ex6	<i>S. gummosus</i>	Fruto	0	0	0	0	0	0
7	Ex7	<i>S. gummosus</i>	Fruto	0	0	0	0	0	0
8	Ex8	<i>S. gummosus</i>	Cáscara	0	0	0	0	0	0
9	Ex9	<i>S. thurberi</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
10	Ex10	<i>L. candida</i>	Tallo	7.5	0	0	0	0	0
11	Ex11	<i>L. candida</i>	Hoja	0	0	0	0	0	0
12	Ex12	<i>P. pringlei</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
13	Ex13	<i>B. filicifolia</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
14	Ex14	<i>Walteria sp.</i>	Completa	0	0	0	0	0	0
15	Ex15	<i>J. cinerea</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
16	Ex16	<i>P. confine</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
17	Ex17	<i>P. confine</i>	Hoja	0	0	0	0	0	0
18	Ex18	<i>B. sarathroides</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
19	Ex19	<i>B. sarathroides</i>	Hoja	0	0	0	0	0	0
20	Ex20	<i>F. diguetii</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
21	Ex21	<i>H. sonorensis</i>	Completa	0	0	0	0	0	0
22	Ex22	<i>L. schotii</i>	Tallo	12	9.5	0	8.5	0	0

23	Ex23	<i>E. americana</i>	Corteza	0	0	0	0	0	0
24	Ex24	<i>P. macrocarpus</i>	Tallo	0	0	0	0	0	0
25	Ex26C	<i>B. odorata</i>	Completa	11	0	0	0	0	0
26	Ex26D	<i>B. odorata</i>	Completa	11	0	0	0	0	0
27	Ex26A	<i>B. odorata</i>	Completa	0	0	0	0	0	0
28	Ex26B	<i>B. odorata</i>	Completa	11	10	0	0	0	0
29	Ex26W	<i>B. odorata</i>	Completa	0	0	0	0	0	0
30	Ex25	<i>Euphorbia sp.</i>	Completa	11	0	0	0	0	0
	Ctrl+			12	28	20	17	8	10
				Amp 10 µg	Amp 10 µg	Amp 10 µg	Clora 30 µg	Genta 4 µg	Genta 1 µg

**Control positivo (Ctrl+): Ampicilina (Amp), 10 µg, Cloranfenicol 30 µg (Clora), Gentamicina a 1 y 4 µg (Genta).

7.2.1. Actividad antibacteriana por unidades formadoras de colonia

Los extractos con actividad se probaron con un número estandarizado de unidades formadoras de colonia (UFC). Los resultados se muestran en la tabla X. El extracto con mayor y más amplia actividad fue *L. schottii*, inhibiendo el crecimiento de *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli*.

Tabla X. Diámetro de inhibición (mm) de discos con 1 mg de extracto en contra de bacterias a 10^6 UFC/mL. Como control positivo se utilizaron con Ampicilina a 10 μ g para *S. aureus* y *L. monocytogenes*, y discos con Cloranfenicol a 30 μ g para *E. coli*.

Código	Especie	Parte	Microorganismo		
			<i>S. aureus</i> 10 ⁶ UFC/mL	<i>L. monocytogenes</i> 10 ⁶ UFC/mL	<i>E. coli</i> 10 ⁶ UFC/mL
Ex2	<i>Prosopis articulata</i>	Hoja	15	15	0
Ex10	<i>Lysiloma candida</i>	Tallo	19	0	0
Ex22	<i>Lophocereus schotti</i>	Tallo	21	12	12
Ex25	<i>Euphorbia sp</i>	Completa	11	0	0
Ex26D	<i>Bursera odorata</i>	Completa	11	0	0
Ex26B	<i>Bursera odorata</i>	Completa	13	13	0
Ctrl +			28	28	25

7.2.2. Termoestabilidad de extractos

Los extractos de *Prosopis articulata*, *Lysiloma candida*, y *Lophocereus schotti* mostraron actividad en *S. aureus* aún después de verse sometidas a los tratamientos de temperatura (Fig. 3). El extracto de *Euphorbia sp.* aún mostraba inhibición a 65°C, sin embargo, a 80°C y 100°C dicha actividad desapareció. En el caso de la fracción hexánica de *B. odorata* su actividad fue afectada al someterse a los tratamientos. En el caso de *L. monocytogenes*, los extractos siguieron mostrando actividad aún después de haberse sometido a los tratamientos de temperatura, caso similar en *E. coli*, donde el único extracto que mostró inhibición también mostró actividad al verse sometido a los tres tratamientos de temperatura (Tabla XI).

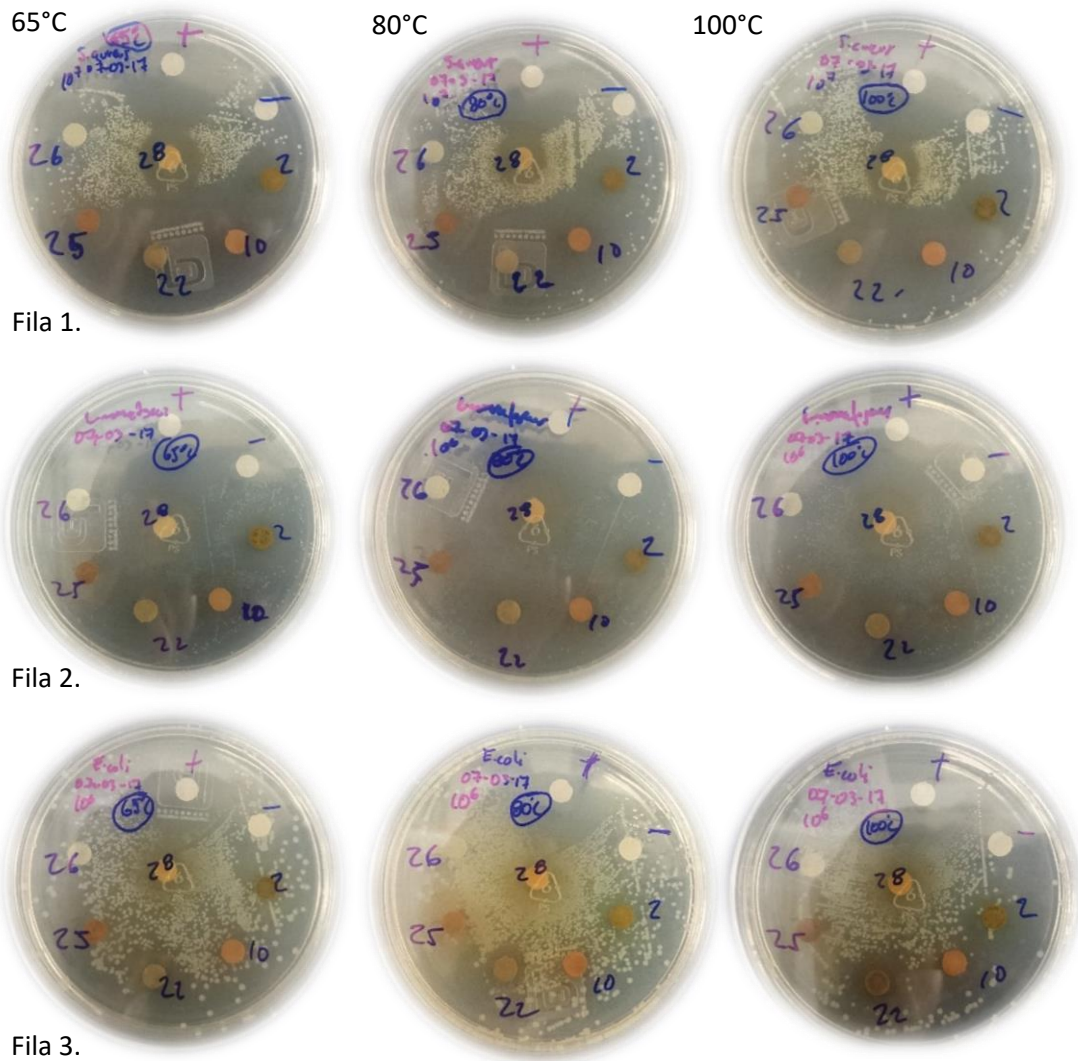


Figura 3. Inóculo bacteriano en cajas petri en donde se muestra la inhibición después del tratamiento de temperatura. Cada una de las filas muestra los tres tratamientos de temperatura de 65°, 80°, y 100°C, respectivamente. Fila 1: *S. aureus*; Fila 2: *L. monocytogenes*; Fila 3: *E. coli*.

Tabla XI. Termoestabilidad de extractos a temperaturas de 60°C, 80°C, y 100°C. en contra de cepas a 10⁶ UFC/mL. Como control positivo: Ampicilina a 10 µg para *S. aureus* y *L. monocytogenes*, y Cloranfenicol a 30 µg para *E. coli*.

Código	Especie	Parte	Microorganismo		
			<i>S. aureus</i> 10 ⁶ UFC/mL 100°C	<i>S. aureus</i> 10 ⁶ UFC/mL 80°C	<i>S. aureus</i> 10 ⁶ UFC/mL 65°C
Ex2	<i>Prosopis articulata</i>	Hoja	17	16	17
Ex10	<i>Lysiloma candida</i>	Tallo	25	23	22
Ex22	<i>Lophocereus schotti</i>	Tallo	27	26	27
Ex25	<i>Euphorbia sp</i>	Completa	0	7	10
Ex26D	<i>Bursera odorata</i>	Completa	0	0	0
Ex26B	<i>Bursera odorata</i>	Completa	12	13	15
Ctrl+			28	28	25
			<i>L. monocytogenes</i> 10 ⁶ UFC/mL 100°C	<i>L. monocytogenes</i> 10 ⁶ UFC/mL 80°C	<i>L. monocytogenes</i> 10 ⁶ UFC/mL 65°C
Ex2	<i>Prosopis articulata</i>	Hoja	12	12	12
Ex10	<i>Lysiloma candida</i>	Tallo	0	0	0
Ex22	<i>Lophocereus schotti</i>	Tallo	14	16	17
Ex25	<i>Euphorbia sp</i>	Completa	0	0	0
Ex26D	<i>Bursera odorata</i>	Completa	0	0	0
Ex26B	<i>Bursera odorata</i>	Completa	12	13	13
Ctrl+			33	33	33
			<i>E. coli</i> 10 ⁶ UFC/mL 100°C	<i>E. coli</i> 10 ⁶ UFC/mL 80°C	<i>E. coli</i> 10 ⁶ UFC/mL 65°C
Ex2	<i>Prosopis articulata</i>	Hoja	0	0	0
Ex10	<i>Lysiloma candida</i>	Tallo	0	0	0
Ex22	<i>Lophocereus schotti</i>	Tallo	12	12	12
Ex25	<i>Euphorbia sp</i>	Completa	0	0	0
Ex26D	<i>Bursera odorata</i>	Completa	0	0	0
Ex26B	<i>Bursera odorata</i>	Completa	0	0	0
Ctrl+			28	28	28

7.3. Fraccionamiento por solventes

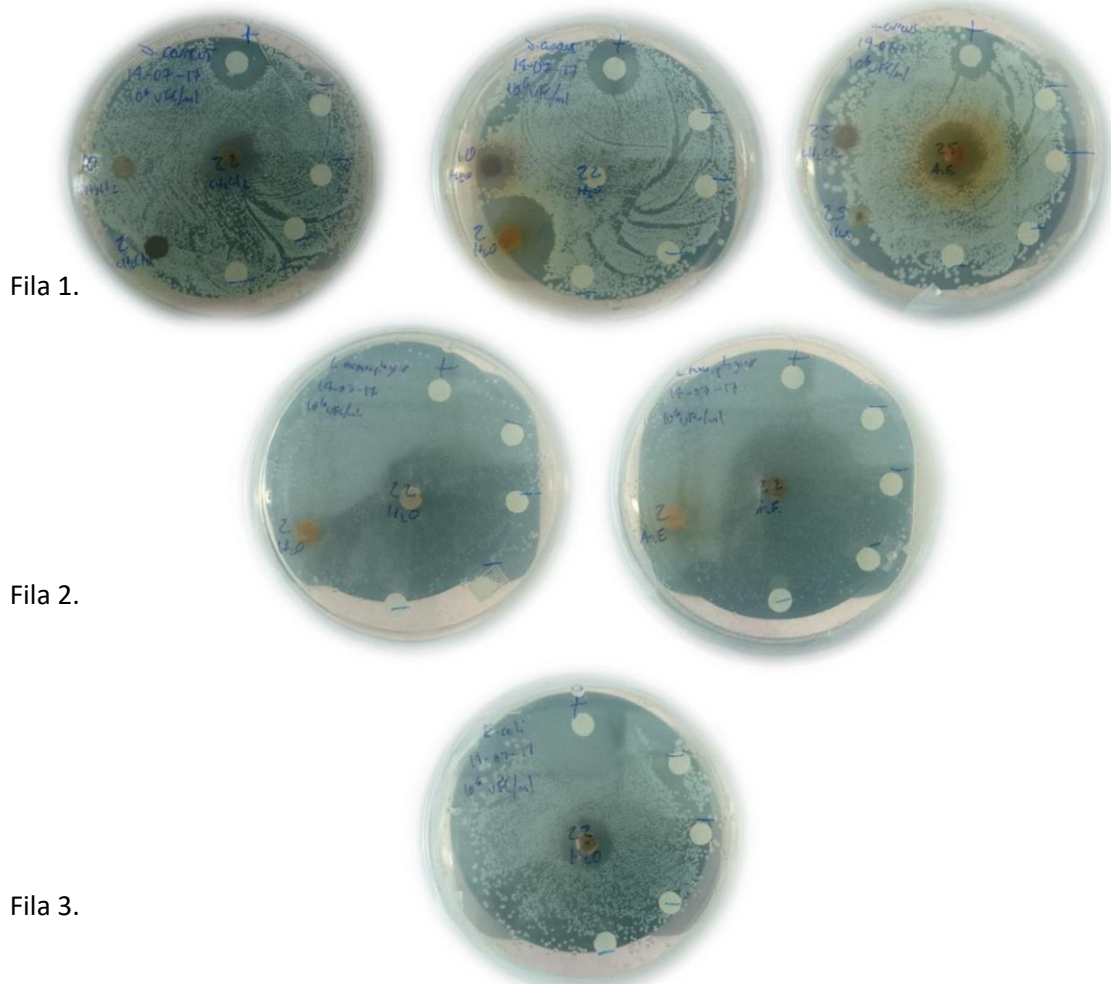
El volumen final de las fracciones varía principalmente por la cantidad de compuestos extraídos, siendo las fracciones más polares las que presentan una mayor cantidad de concentrado. Cada extracto dio como resultado fracciones de hexano, CH₂Cl₂, EtOAc, y H₂. Las fracciones se conservaron a 4°C en contenedores de cristal envueltos en aluminio para evitar la degradación de compuestos fotolábiles, figura 4.

7.4. Pruebas de actividad antimicrobiana de fracciones

Los extractos con mayor potencial fueron seleccionados con base a la actividad en las pruebas iniciales, dichos extractos fueron de las especies: *P. articulata*, *L. candida*, *L. schotii*, *Euphorbia sp.*, y *B. odorata*; sin embargo, este último se descartó debido a que la cantidad de muestra no fue la suficiente para proseguir con los ensayos posteriores. La figura 5 muestra los halos de inhibición de los bioensayos, y en la figura 6, se muestran los resultados de la medición, los cuales indican que la actividad antibacteriana se mantiene sólo en determinadas fracciones, y dicha varía dependiendo de la cepa en la que se probó.



Figura 4. Fracciones de CH_2Cl_2 , y H_2O de mezquite, palo blanco (fracción acuosa y CH_2Cl_2) y garambullo.



Fila 1.

Fila 2.

Fila 3.

Figura 5. Ensayo de difusión en agar con discos impregnados con 1 mg de las fracciones de los extractos que mostraron actividad antibacteriana. En la fila 1: *S. aureus*; fila 2: *L. monocytogenes*; fila 3: *E. coli*. Extracto 2: *P. articulata*, 10: *L. candida*, 22: *L. schottii*, 25: *Euphorbia sp.*, Fracciones. Hex: Hexano; H₂O: Acuosa; AcE: Acetato de etilo; CH₂Cl₂: Diclorometano. (+): Control Positivo; (-): Control negativo

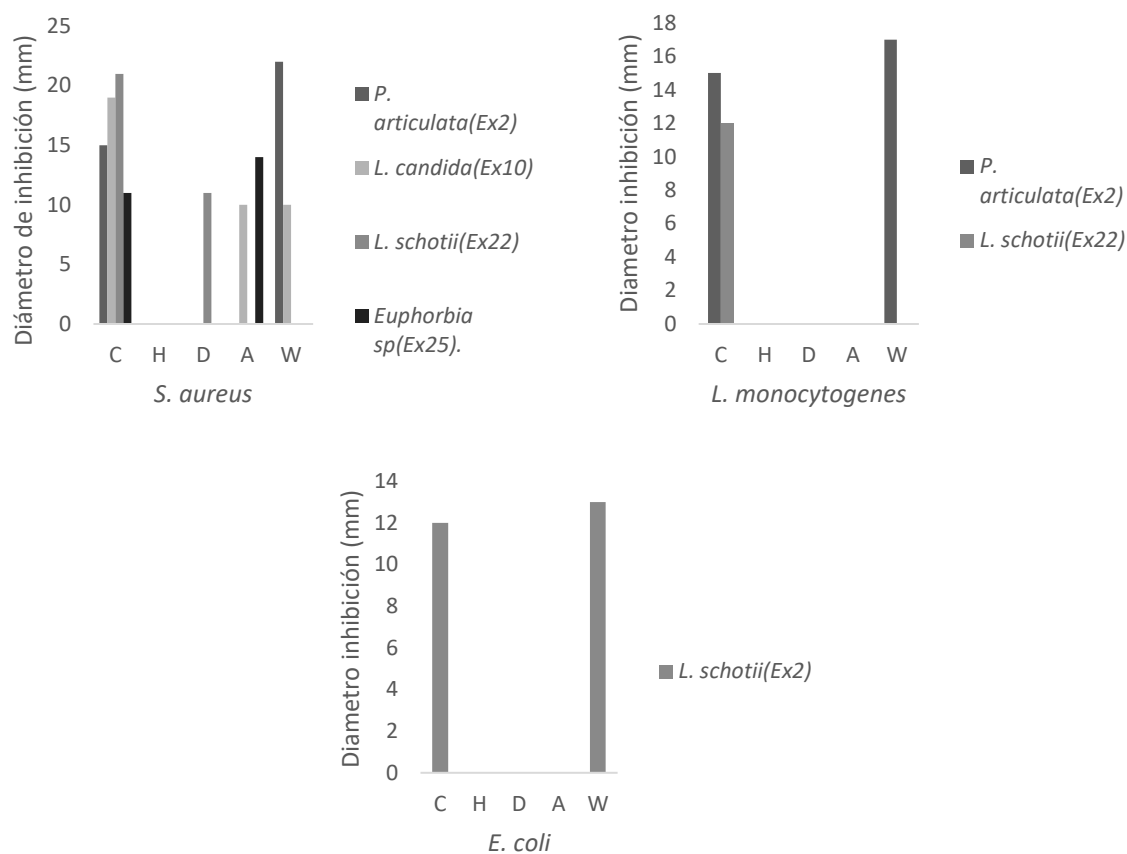


Figura 6. Diámetro de inhibición, en mm, de las fracciones de los extractos que mostraron inhibición en pruebas antibacterianas a 10^6 UFC/mL. En el eje de las abscisas: C= extracto sin fraccionar o concentrado; H= fracción de hexano; D= fracción de CH₂Cl₂; A= fracción de EtOAc; W= fracción de H₂O.

7.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los halos de inhibición de los ensayos se muestran en la figura 7, y se puede observar que la mayoría de los extractos no presentan inhibición a concentraciones menores a 1 mg, a excepción de Ex2W y Ex25A. Los resultados de la concentración mínima inhibitoria se presentan en la figura 8 siendo la CMI de Ex2W para *S. aureus* 0.125 mg/mL, y para *L. monocytogenes* de 0.25 mg/mL. Complementariamente se realizó un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. El resultado mostró que no existen diferencias entre las medianas de las diferentes concentraciones.

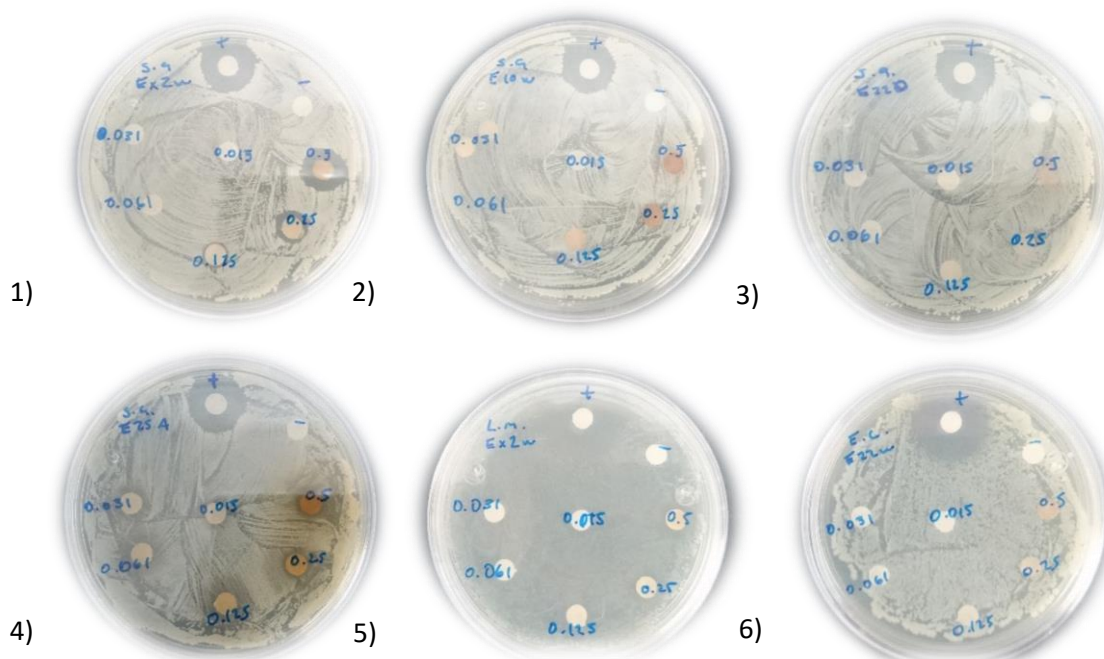


Figura 7. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones que mostraron actividad antibacteriana en las pruebas de inhibición con fracciones. De izquierda a derecha. En *S. aureus*: 1) Ex2W, 2) Ex10W, 3) Ex22D, 4) Ex25A; en *L. monocytogenes*: 5) Ex2W; en *E. coli*: 6) Ex22W.

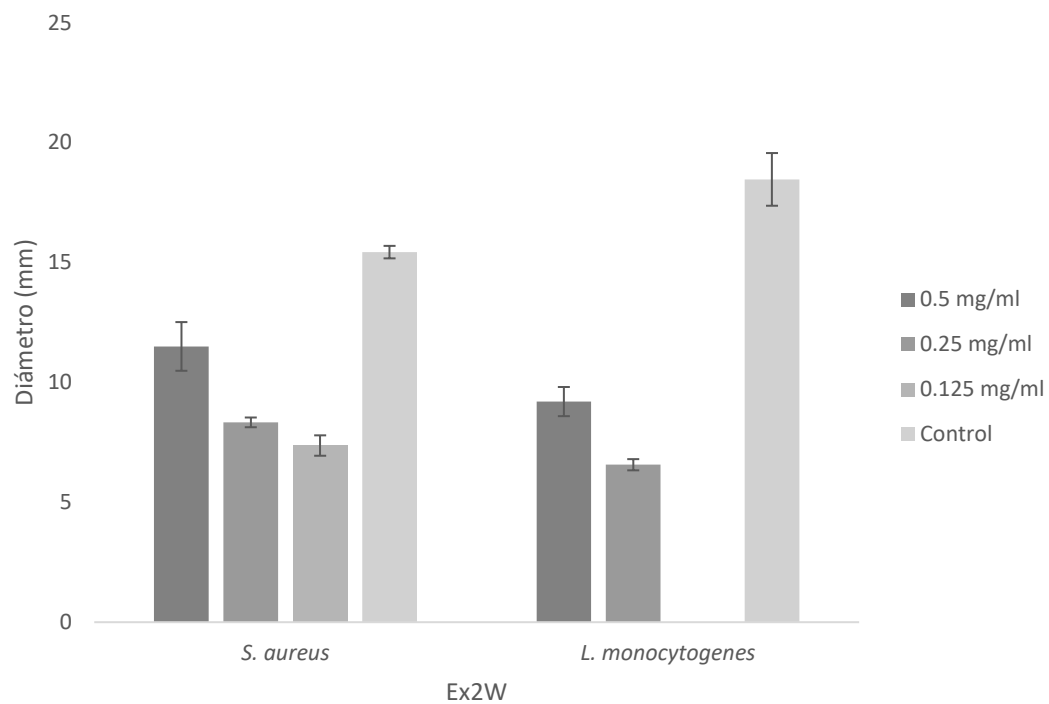


Figura 8. Concentración mínima inhibitoria de la fracción acuosa del extracto de *Prosopis articulata* (Ex2W) en contra de *S. aureus*, y *L. monocytogenes*. Los datos presentados son los valores de las medias \pm el error estándar a intervalos de confianza del 95%.

7.6. Ensayo de toxicidad en *A. salina*

En la figura 9 se muestran las imágenes del desarrollo del ensayo de toxicidad con *A. salina*, el cual se realizó a las 48 h después de la obtención de los nauplios. En la figura 10 se encuentran los resultados del ensayo de toxicidad, para los cuales el extracto Ex2C demostró ser uno de los más tóxicos, y en su contraparte, el extracto Ex10W el que presentó menor toxicidad. Los extractos Ex2W y Ex22C mostraron toxicidad $< 100 \mu\text{g/mL}$ por lo cual no se compararon con la toxicidad de los extractos restantes en la figura. Ex2W y Ex22C se consideran extractos con una toxicidad moderada a alta, sin embargo, esta debe ser determinada con experimentos adicionales con el fin de especificar una concentración. Se utilizó el modelo estadístico de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia del 95% para comparación de medianas, el cual mostró que existen diferencias significativas entre las medianas de los grupos. En la figura 10, los colores de las barras denotan las diferencias que hay entre ellos, siendo del mismo color los grupos los cuales no presentan diferencias significativas entre sus medianas.

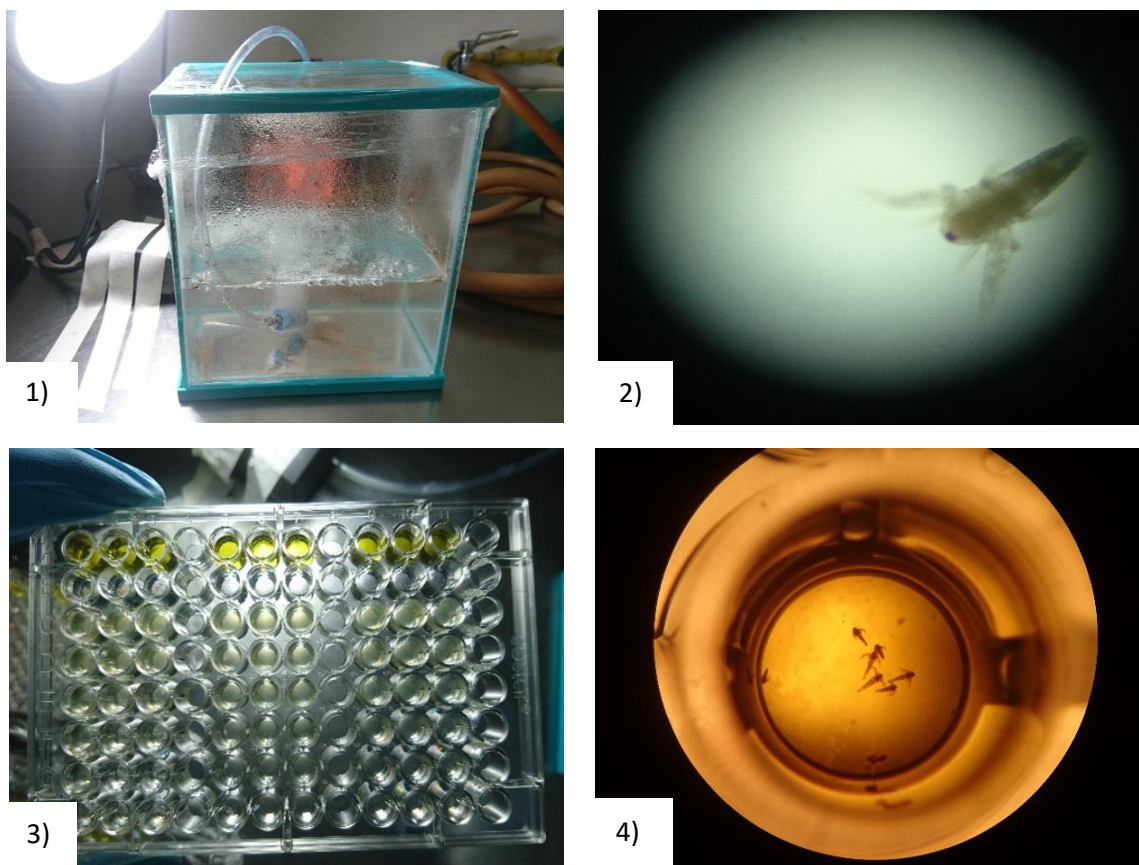


Figura 9. Ensayo de Toxicidad con el modelo de *A. salina*. 1) Crecimiento de nauplios en pecera; 2) Nauplio II de *A. salina*; 3) Ensayo de toxicidad en microplaca de 96 pozos; 4) Pocillo de microplaca con nauplios II de *A. salina*.

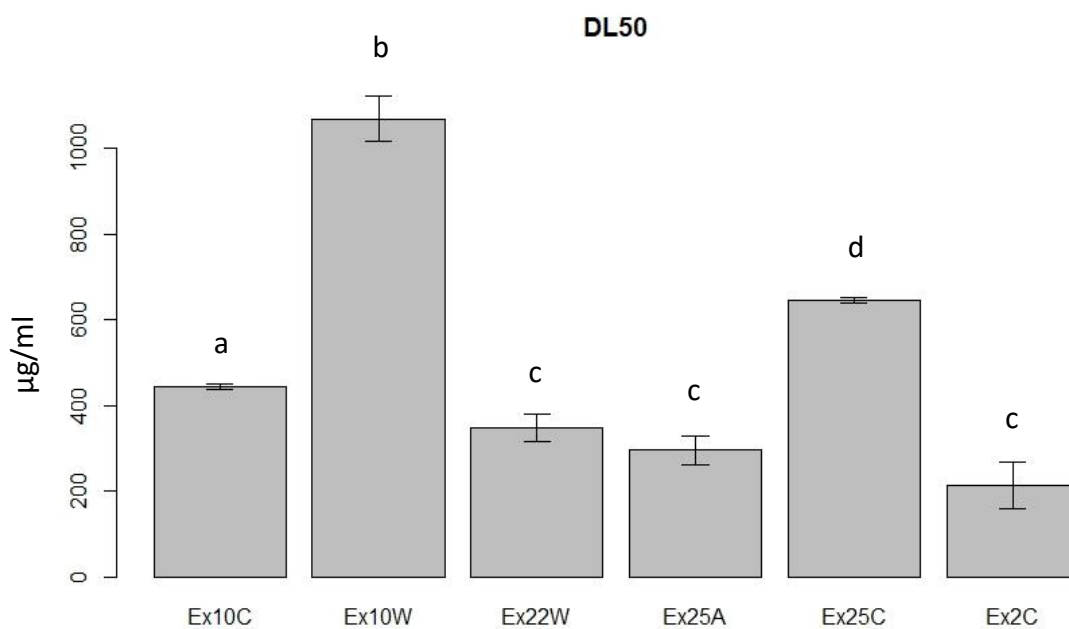


Figura 10. Análisis de dosis-respuesta probit en el cual se determinó la toxicidad, expresada en DL₅₀ (µg/mL), de los diferentes extractos y fracciones en el modelo de *A. salina*. Los datos presentados son los valores de las medias ± el error estándar a intervalos de confianza del 95%. Los datos con la misma letra no son estadísticamente diferentes a $P < 0.05$. Ex2W, y Ex22C obtuvieron una DL₅₀ <100 µg/mL, por lo que no se muestran en esta gráfica.

7.7. Determinación de metabolitos secundarios por medio DIESI-MS

Los resultados de la ionización posteriores al análisis con el programa Rstudio, para el cual se formaron los heatmaps se encuentran detallados en en la figura 11. En total se detectaron 74 iones en el extracto Ex2, 68 iones en el extracto Ex10, 83 iones en Ex22, y 148 en Ex25.

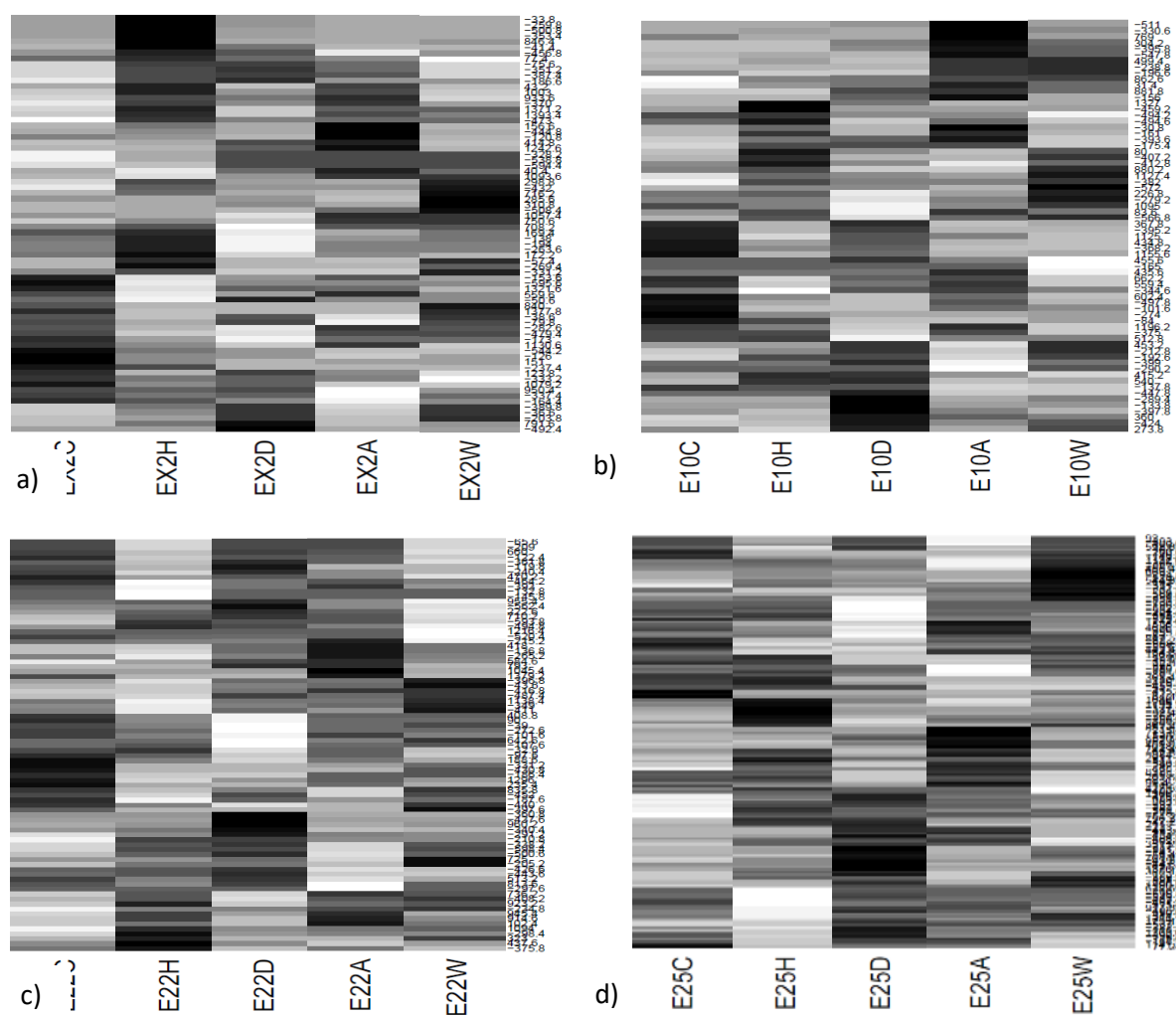


Figura 11. Mapa de intensidades m/z que agrupó los iones más intensos del experimento incluyendo iones positivos y negativos de cada uno de los extractos y sus respectivas fracciones. El color negro representa los iones más intensos, y el blanco los menos intensos. Los iones representativos de los extractos y fracciones de: a) *P. articulata*; b) *L. candida*; c) *L. schottii*; d) *Euphorbia sp.*

8. DISCUSIÓN

8.1. Acción antibacteriana de extractos crudos

De acuerdo con el criterio de Abadie *et al.* (2014) se crearon placas con un volumen de 10^6 UFC, y se realizaron las pruebas de actividad en ellas. Los resultados fueron favorables dando placas con cultivos cuantificables.

El extracto de Garambullo, *L. schottii* (Ex22) mostró inhibición en el crecimiento de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, e incluso *E. coli*, lo que podría demostrar que sus metabolitos tienen un amplio espectro de inhibición tanto de bacterias gram positivas, como de bacterias gram negativas. Estas últimas siempre han resultado ser un problema, ya que lo demostrado en la investigación de Encarnación *et al.* (1998) en un screening de 109 plantas utilizadas en la medicina tradicional de Baja California Sur, extractos de sólo tres especies presentaron inhibición en contra de la bacteria gram negativa *E. coli*: *P. acutifolia*, *S. villosa*, y *L. alba*. La actividad biológica del Garambullo fue determinada en una cepa de *L. monocytogenes* y *S. typhi* por Morales *et al.* (2007), aunque no se muestra el tamaño del halo de inhibición ni la CMI en el trabajo mencionado, los resultados parecen ser positivos para *L. monocytogenes*, lo que corrobora los resultados obtenidos en el screening de esta investigación.

En el caso del mezquite, *P. articulata* (Ex2), se pudo apreciar inhibición en contra de *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Este parece ser un nuevo registro de actividad antibacteriana. Dicha particularidad se puede deber a que esta especie es endémica del noroeste de México, y al parecer su potencial antimicrobiano no había sido explorado hasta ahora. Aunque se tiene el conocimiento de que compuestos aislados de especies del género *Prosopis*, como *Prosopis glandulosa* ha mostrado actividad en contra de bacterias como *Mycobacterium* (Abdur *et al.*, 2011).

El palo blanco, *L. candida* (Ex10), inhibió ligeramente el crecimiento de *S. aureus*, esta inhibición en la misma especie de bacteria, ya se había documentado en el trabajo de Encarnación *et al.* (1998), aunque no se define la cepa manejada. Esto corrobora lo demostrado en este trabajo.

Al carecer de información de las moléculas particulares que le confieren la actividad antibacteriana a los extractos, no se puede confirmar un mecanismo de inhibición del extracto, debido a que dicha actividad pudiese ser obra de una sinergia de metabolitos, y no uno solo en particular.

La golondrina, *Euphorbia sp.* (Ex25), mostró inhibición solamente en *S. aureus*. Aunque no se pudo determinar la especie de esta Euphorbiacea, se cree que pertenece a la especie *E. polycarpa*, ya que es la única cuyo nombre común y distribución coinciden en Baja California Sur, México. En la investigación presentada por Encarnación *et al.* (1991) menciona que el extracto de la especie *Euphorbia polycarpa* presente actividad antibacteriana.

Ambas fracciones del torote blanco, *B. odorata* (Ex26), muestran inhibición en *S. aureus*, aunque sólo una fracción, la de EtOAc, inhibe también a *L. monocytogenes*. Esto nos expresa que los compuestos con mayor polaridad podrían ser los efectores de la acción sobre dicha cepa bacteriana. En investigaciones previas, el extracto de *B. odorata* no mostró actividad sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli* (Murillo *et al.*, 2001). En este trabajo no hubo inhibición de dicho extracto en *E. coli*, sin embargo, el extracto de dicha especie inhibió el crecimiento de la cepa *S. aureus* (ATCC 29213). La actividad podría manifestar que algunas cepas de *S. aureus* son más susceptibles. O que las condiciones de la especie vegetal al momento de la colecta del material fueron diferentes.

Ningún extracto presentó actividad inhibitoria en contra de *L. innocua.*, *K. pneumoniae*, y *A. baumannii*. Esto podría indicar que los compuestos que le confieren actividad a los extractos podrían estar actuando a nivel de pared celular, ya que esta difiere en composición entre ambos grupos de bacterias, y también funge como la primera línea de

defensa de estas bacterias para protección en contra de moléculas o patógenos que puedan comprometer su integridad (Brown *et al.*, 2015).

En el caso de los extractos que recibieron tratamiento de calentamiento (Tabla XI) mostraron una actividad muy similar en *S. aureus* que los extractos sin tratamiento, a excepción del extracto de la fracción hexánica de *B. odorata*, la cual perdió completamente dicha actividad. Y el extracto de *Euphorbia sp.* el cual mostraba menos actividad conforme iba aumentando la temperatura. La actividad de dichos extractos se pudo haber visto comprometida probablemente porque dicho extracto puede ser rico en terpenos (Avalos y Perez-Urria, 2009), los cuales son fácilmente oxidables, la velocidad de oxidación de los compuestos podría aumentar conforme aumenta la temperatura.

En comparación con el extracto original, la actividad del extracto de *P. articulata* que recibió el tratamiento de calentamiento se vio poco afectada en el ensayo de inhibición en contra de *L. monocytogenes*. Incluso dicha actividad se mantuvo estable entre los tres tratamientos. Esto nos podría indicar que los metabolitos que pudieran estar actuando resultan sumamente estables a altas temperaturas. No existen registros de antecedentes que demuestren la termoestabilidad de dichos extractos.

En *E. coli*, el único extracto con actividad, proveniente de *L. schotti*, presentó la misma inhibición tanto el extracto sin tratamiento, como los tres tratamientos de temperatura. Esto indica que el bioactivo de *L. schotti* que le confiere la actividad antibacteriana no se ve afectado por temperaturas tan altas como 100°C.

8.2. Actividad antibacteriana de fracciones

El fraccionamiento de extractos por el método líquido-líquido ha resultado ser un método eficiente para obtener fracciones de diversa polaridad. Dichas fracciones han mostrado su actividad puntual como antioxidante (Karimi *et al.*, 2015), el aislamiento y caracterización de algunos antineoplásicos (Petit *et al.*, 2012), y sin olvidar la actividad antimicrobiana (Delaquis *et al.*, 2002).

En esta investigación se observó la capacidad de las fracciones de los extractos que mostraron actividad antibacteriana en los ensayos iniciales, siendo las fracciones acuosas las de mayor interés. Dicha cualidad se podría deber a la presencia los compuestos acarreados en esta fracción, entre los cuales se encuentran comúnmente los alcaloides (Murphy, 1999), que presentan gran actividad biológica entre las cuales destacan la actividad anticancerígena (Moudi *et al.*, 2013), y por supuesto la actividad antimicrobiana (Faizi *et al.*, 2003); a los terpenoides, constituyentes principales de algunos aceites esenciales (Ávalos y Pérez- Urría, 2009) cuya actividad biológica también ha sido descrita en variado número de investigaciones, en los cuales destacan su actividad anti-VIH, antitumoral (Tolstikova *et al.*, 2006), y antibacteriana (Cantrell *et al.*, 2001); e incluso algunos péptidos antimicrobianos, los cuales también presentan actividad antibacteriana en diversas cepas de interés (Yount y Yeaman. 2013).

El extracto Ex2W, fracción acuosa del extracto de *P. articulata*, demostró una actividad marcada en contra de *S. aureus*, y *L. monocytogenes*, cuyas CMI fueron de 0.125mg/mL, y 0.25 mg/mL, consecutivamente. En primer lugar, se tiene que destacar que la actividad antibacteriana del extracto de *P. articulata* reportada en esta investigación, resultaría ser un nuevo registro de actividad biológica de esta especie. La actividad antibacteriana de Ex2W podría estar aunada a compuestos de naturaleza alcaloide, ya que se ha reportado un compuesto llamado Juliflorina, un alcaloide aislado de la especie hermana *P. juliflora* (Ahmad *et al.*, 1978), cuya actividad antibacteriana fue probada en una cepa de *S. aureus*, inhibiendo el crecimiento de esta a concentraciones de hasta 1.0 µg (Ahmad *et al.*, 1985). Este no ha resultado ser el único registro de actividad de compuestos o extractos de la especie *P. juliflora*; Una investigación realizada por Odhiambo y colaboradores (2015), demostró que el extracto etanólico de las partes aéreas de *P. juliflora* inhibía el crecimiento de *E. coli* (ATCC-25922) a concentraciones de 100 mg/mL. En este caso, Ex2C y Ex2W no mostraron inhibición en contra de ninguna de las cepas gram (-) con las que se trabajó, lo que podría decir que el, o los compuestos bioactivos son alcaloides con diferente conformación química, o que estos están unidos a un complejo no alcaloideo el

cual no puede ser transportado a través de paredes celulares típicas de bacterias gram negativas. Como se ha mencionado a lo largo de este escrito, el uso de métodos de extracción con solventes polares - semi polares, como en el caso del etanol, acarrearán una cantidad considerable de alcaloides con posible actividad biológica. Debido al escaso número de investigaciones de actividad antibacteriana de extractos del género *Prosopis*, no se puede asegurar que todos los compuestos que muestren inhibición en contra de bacterias sean del grupo de los alcaloides, sin embargo, esto abre una ventana de oportunidad para continuar con el estudio de las capacidades antimicrobianas de la especie *P. articulata*, endémica del estado de Baja California Sur.

Los alcaloides son moléculas con conformaciones complejas de muy diversa naturaleza, los cuales actúan a nivel antibacteriano inhibiendo el crecimiento ya sea por inhibición de la división celular inhibiendo el ensamblado del anillo FtsZ y la acción de la GTPasa (Domadia *et al.*, 2008); inhibición de topoisomerasas del tipo II, causando la muerte bacteriana debido a la fragmentación de cromosomas; o inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, evitando así la replicación del ADN bacteriano (Cushnie *et al.*, 2014). Lo cual explicaría su amplio espectro de inhibición tanto en cepas gram positivas, como en gram negativas.

Ex10, extracto del Palo blanco, *L. candida*, mostró actividad en dos de sus fracciones Ex10A, y Ex10W. La fracción acuosa del extracto acarreará compuestos más polares que la de EtOAc, sin embargo, los resultados muestran que ambas fracciones tienen una actividad baja en comparación del extracto concentrado, lo que indica que el compuesto bioactivo presentaría una polaridad media y podría ser parte de la familia de los compuestos fenólicos tipo flavonoides (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Al igual que el registro de actividad de *P. articulata*, la actividad antibacteriana de *L. candida* podría pertenecer a un nuevo registro. El género *Lysiloma*, de la familia Fabaceae, es nativo del continente americano, y los metabolitos registrados asociados al género pertenecen al grupo de los alcaloides (ILDIS World Database of Legumes, 2014). Esto podría indicar que, como se

mencionaba anteriormente, los compuestos bioactivos podrían pertenecer al grupo de los compuestos fenólicos, o a una sinergia polifenol-alcaloide, lo que indicaría que la actividad antibacteriana se podría ver afectada negativamente por la disociación de dicho complejo.

Ex22D, fracción de CH₂Cl₂ del extracto de la planta conocida como garambullo, o cabeza de viejo, *L. schottii*, resultó ser la fracción la cual acarrea los productos con actividad antibacteriana. La familia de compuestos que principalmente se concentran en esta fracción son algunos diterpenoides (Mendoza *et al.*, 1997). Se menciona en algunas investigaciones, como la de Morales Rubio en 2006, que el extracto de *L. schottii* mostró actividad bactericida, desafortunadamente no fue posible obtener el documento probatorio de dicho antecedente, por lo cual el registro de actividad del extracto en *S. aureus* y *E. coli* se puede considerar como nuevo. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Morales Rubio *et al.* (2007) se comprueba la actividad antibacteriana del extracto metanólico en una cepa de *L. monocytogenes*, lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación del extracto Ex22C, no obstante, dicha actividad desaparece en todas las fracciones que se obtuvieron del extracto concentrado, lo que podría indicar una actividad sinérgica entre los metabolitos los cuales le confieren dicha propiedad antibacteriana.

En el caso de *S. aureus*, algunas investigaciones mencionan que los extractos de *L. schottii* poseen un gran número de compuestos del tipo alcaloide (Djerassi *et al.*, 1958; Kircher 1969), aunque sería poco probable que los mencionados fueran participe de la actividad en esta fracción, debido a que la separación por medio de CH₂Cl₂, acarrea, como mencionamos anteriormente, compuestos del tipo terpenoide o flavonoide (Cowan *et al.*, 1999).

La fracción acuosa del extracto de *L. schottii*, Ex22W, resultó ser la única fracción con actividad antibacteriana en *E. coli*. Como se mencionó anteriormente, Ex22C fue el único extracto de la lista efectivo en bacterias gram positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes*), y una gram negativa (*E. coli*), aunado a la actividad de Ex22W, se puede inferir que los

compuestos que podrían estar generando la actividad antibacteriana pertenezcan a los grupos de alcaloides o incluso péptidos antimicrobianos (Cowan *et al.*, 1999). La acción antibacteriana se explicó brevemente en la página 42 de este documento, sin embargo, estos podrían no ser el producto activo del extracto, y la actividad se podría deber a la acción de péptidos antimicrobianos que actúan a nivel de pared celular (Nawrot *et al.*, 2014). No existe registro de péptidos antimicrobianos aislados de la especie *L. schottii* en particular, no obstante, en una investigación realizada por Aboye *et al.* (2015), se consiguió el aislamiento de un péptido antimicrobiano denominado Ep-AMP1, proveniente de la especie *Echinopsis pachanoi*, una especie perteneciente a la misma familia que *L. schottii*, cuya actividad resultó positiva en bacterias como *S. aureus* y *E. coli*. Dicho descubrimiento podría ser una pista para atribuir la actividad biológica a un grupo de moléculas específico.

8.3. Toxicidad de extractos en el modelo de *A. salina*

El ensayo de toxicidad utilizando el camarón salino (*A. salina*), ha demostrado ser una herramienta eficaz para la medición de la toxicidad de los productos naturales. En este caso los extractos Ex2W, y Ex22C mostraron toxicidad <100 µg/mL. En el caso de Ex2W (*P. articulata*) no existen registros de dicha toxicidad, por lo que demostrar la misma es de suma importancia para la medicina tradicional de Baja California Sur.

Como se ha mencionado anteriormente, los extractos del género *Prosopis* son utilizados en la medicina tradicional en diversas partes del mundo (Encarnación *et al.*, 1998; Mazzuca *et al.*, 2003). Adoum *et al.* (1997), evaluaron la actividad citotóxica del extracto etanólico, y fracciones, de *P. africana* en el modelo de *A. salina*, obteniendo solo toxicidad del concentrado de etanol a una concentración de 594 µg/mL, lo cual indicaría que, compuestos como alcaloides, o taninos, serían los metabolitos que le confieren dicha actividad, debido a que extractos como el de *Hibiscus sabdariffa*, el cual contenía alcaloides entre sus constituyentes principales, mostró ser tóxico en ensayos con *A. salina*

a concentraciones de 5.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Olaleye, 2007). Al igual que los alcaloides, los taninos han resultado tóxicos en modelos de *A. salina*, tal está el caso del extracto de *Callistemon citrinus*, el cual presentó toxicidad a concentraciones de 65.5 mg/mL . Dicho extracto contaba con presencia de taninos entre sus principales constituyentes (Ali *et al.*, 2011). En un estudio similar del extracto de *Punica granatum*, se mostró la capacidad citotóxica en *A. salina* a concentraciones de 198.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$; en dicha investigación se resaltó la presencia de taninos en los análisis fitoquímicos previos (Ali *et al.*, 2015).

El concentrado de *L. candida* (Ex10C) demostró ser medianamente tóxico en el ensayo de bioactividad con una DL_{50} de 442.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$, toxicidad que se vio considerablemente reducida en la fracción acuosa del mismo con una DL_{50} de 1067.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ex10W). Al igual que la actividad antibacteriana, no existe registro acerca de la toxicidad del extracto de *L. candida* (Ex10) en ningún modelo biológico, por lo que este se convierte en un nuevo registro. Como se mencionó anteriormente en el texto, la familia Fabaceae posee principalmente compuestos del tipo alcaloide (ILDIS World Database of Legumes, 2014), los cuales probablemente se presentarían tanto en el concentrado como en la fracción acuosa. Se podría inferir que lo que le confiere la toxicidad mayor a Ex10C que a Ex10W sería la acción de un complejo y no un grupo específico sería el autor de la toxicidad en *A. salina*.

Por otro lado, el extracto Ex22C ha mostrado actividad tóxica en investigaciones previas en donde se calculó la DL_{50} a concentración de 70.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en modelos de *A. salina* (Morales-Rubio *et al.*, 2007). En esta investigación la DL_{50} del extracto Ex22C se presentó como $<100 \mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual podría estar muy cerca de la concentración reportada por Morales-Rubio *et al.* (2007). La toxicidad de Ex22C ha sido probada en diferentes modelos, como en el caso de la investigación de Orozco-Barocio *et al.*, (2013), en la cual utilizaron el modelo de ratones BALB/c a los cuales fueron administradas dosis de 50-5000 mg/kg del extracto de *L. schottii* sin aparente toxicidad. En el caso de la fracción acuosa de *L. schottii* (Ex22W) se determinó que la DL_{50} fue de 350.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentración relativamente

mayor que la de su concentrado. Como se mencionó anteriormente en el apartado de actividad antimicrobiana, los productos que podrían ser más abundantes en esta fracción pertenecerían al grupo de los alcaloides, taninos, o incluso péptidos antimicrobianos (Cowan *et al.*, 1999). Sin embargo, al no contar con moléculas aisladas, no se puede reconocer a ciencia cierta.

En el caso de la toxicidad del extracto Ex25C, y su fracción de CH₂Cl₂ (Ex25D) se ha documentado que las especies del género *Euphorbia*, el cual se distribuye en todo el mundo, principalmente en zonas semi-desérticas, poseen entre sus constituyentes naturales más abundantes a los terpenoides (Hegnauer, 1989; Jassbi, 2006; Amin *et al.*, 2017) asociados al látex blancuzco que se encuentra en prácticamente todas las especies del género *Euphorbia*.

8.4. Determinación de metabolitos secundarios por espectrometría de masas de inyección directa por electro spray (DIESI-MS)

La caracterización por DIESI-MS resulta ser una herramienta sumamente útil para la fenotipificación bioquímica de diversos cultivos de plantas (García-Flores *et al.*, 2015). Se requiere de una serie de preparaciones previas para la determinación de metabolitos con actividad biológica (antibacteriana, citotóxica, antitumoral), así como el uso de diversos equipos para la purificación de moléculas de interés.

En investigaciones de productos naturales utilizando espectrometría de masas se han logrado identificar compuestos como glicósidos diterpénicos (Jackson *et al.*, 2009), e incluso alcaloides como conhidrinas, y escopolaminas (Talaty *et al.*, 2005). Lo que indica que dicha técnica podría ser de gran utilidad para la determinación de metabolitos secundarios conocidos.

En esta investigación, la actividad antibacteriana se podría atribuir a las moléculas asociadas a los iones más intensos, debido a que el número de células bacterianas por

mililitro utilizadas en esta investigación no resultarían afectadas a concentraciones de moléculas de iones de menor intensidad. En el caso del extracto Ex2W los iones-508.4, 310.8, 285.6, o 716.2 pudiesen ser por si solos, o de manera sinérgica, los que le confieren la actividad antibacteriana a dicha fracción. Esta lógica podría ser extrapolada a los iones más intensos de las fracciones del resto de los extractos, sin embargo, la posible actividad sinérgica genera una posibilidad de combinaciones en extremo amplia, que se podría dar entre moléculas de iones muy intensos, o incluso entre iones de mayor y menor intensidad. Para esta investigación en particular, en donde se desconoce la, o las moléculas que confieren la actividad antibacteriana a los extractos y sus respectivas fracciones, el uso de la técnica de espectrometría de masas por si sola no otorga la información necesaria para determinar compuestos con bioactividad específica debido a que las fracciones de los extractos inyectados podrían contener cientos de compuestos con una m/z similar, como dímeros (Lian e Yu, 2010), lo cual podría generar falsos positivos (Crawford y Hill, 2013).

La m/z de los iones más representativos de los extractos y sus fracciones fueron introducidos a la base de datos MassBank© para la comparación de metabolitos previamente determinados, no obstante, los resultados arrojados por la base de datos fueron sumamente variados, lo que nos indica que las muestras analizadas por DIESI-MS requieren de un procesamiento previo para filtrar los metabolitos que no presenten la actividad biológica deseada.

9. CONCLUSIONES

Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos en contra de *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 15313, y *E. coli* O157:H7, siendo los extractos Ex2 (*P. articulata*), Ex10 (*L. candida*), Ex22 (*L. schottii*), y Ex25 (*Euphorbia* sp.) los de mayor interés. Ningún extracto mostró actividad en *Listeria innocua*., *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, y *Acinetobacter baumannii complex*. El fraccionamiento de los extractos demostró ser una gran herramienta para determinar los posibles compuestos con bioactividad con base a su solubilidad en cada una de dichas fracciones. Las fracciones más polares, en particular las fracciones de H₂O de *L. schottii* y *P. articulata* demostraron ser los más interesantes debido a su actividad antibacteriana, y el nuevo registro, en el caso de *P. articulata*, por lo que se propone estudiar a fondo los concentrados de dicha especie con el fin de caracterizar completamente las moléculas con bioactividad.

En su mayoría los extractos demostraron ser termoestables, lo que indica que las moléculas dentro de este concentrado podrían ser calentadas a temperaturas de hasta 100°C sin aparente pérdida de sus cualidades físico químicas. Este hecho permitiría la manipulación de dichos extractos a temperaturas altas sin perder bioactividad.

Aunque el extracto concentrado de *L. schottii* presentó una toxicidad alta en el modelo de *A. salina*, esta toxicidad se vio reducida en la fracción acuosa que mostraba actividad antibacteriana, por lo que el uso de dichas fracciones no presentaría un riesgo para el consumo humano. Por contraparte, la fracción acuosa de *P. articulata* demostró alta toxicidad, lo que implicaría un riesgo a la salud el consumo de los componentes en dicha fracción.

Se realizó una caracterización por DIESI-MS, sin embargo, dicha caracterización precisa ser complementada con técnicas como cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta presión, o resonancia magnética nuclear, para determinar con un mayor grado de certeza los metabolitos que confieren la actividad biológica de los extractos.

10. LITERATURA CITADA

- Abadie, R., R. Medina, L. Ruiz, A. Tresierra. 2014. Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias, Iquitos-Perú. *Revista ECI Perú*, 11(1):31-38
- Aboye, T., A. Strömstedt, S. Gunasekera, J. Bruhn, H. El-Seedi, K. Rosengren, U. Göransson. 2015. A cactus-derived toxin-like cystine knot peptide with selective antimicrobial activity. *ChemBioChem*, 16(7): 1068 -1077.
- Abreu, A., A. Coqueiro, A. Sultan, N. Lemmens, H. Kim, R. Verpoorte, W. Van Wamel, M. Simoes, Y. Choi. 2017. Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: isoflavonoids from *Cytisus striatus* as antibiotic adjuvants against MRSA. *SCI REP*. 7:3777.
- Adoum, O., N. Dabo, M. Fatope. 1997. Bioactivities of some Savanna plants in the brine shrimp lethality test and in vitro antimicrobial assay. *INT J PHARMACOGN*. 35(5):334-337.
- Ahmad, V., A. Basha, W. Haque. 1978. New alkaloids from *Prosopis juliflora*. *Z NATURFORSCH*. 33b:347-348.
- Ahmad, A., K. Khan, V. Ahmad, S. Qazi. 1985. Antibacterial activity of Juliflorine isolated from *Prosopis juliflora*. *PLANTA MED*. 1: 339.
- Ali, N., G. Ahmed, S. Ali, I. Shah, M. Ghias, I. Khan. 2011. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *Callistemon citrinus curtis*. *BMC COMPLEM ALTERN MED*. 11(99):8.
- Ali, N., A. Jamil, S. Ali, I. Shah, G. Ahmed, M. Junaid, Z. Ahmed. 2015. Parasitocidal and brine shrimp cytotoxicity potential of crude methanolic extract of rind of *Punica granatum* Linn against round worms and tape worms. *PAK J PHARM SCI*. 28(3):959-962.
- Amin, E., A. Moawad, H. Hassan. 2017. Biologically-guided isolation of leishmanicidal secondary metabolites from *Euphorbia peplus* L. *SAUDI PHARM J*. 25(2): 236-240.
- Apu, A., M. Muhit, S. Tareq, A. Pathan, A. Jamaluddin, M. Ahmed. 2010. Antimicrobial activity and brine shrimp lethality bioassay of the leaves extract of *Dillenia indica* Linn. *J YOUNG PHARM*. 2(1):50-53.

- Arias, R., U. Rosado, A. Vargas, C. Grajales. 2016. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. REV MED INST MEX SEGURO. SOC. 54(1):20-24.
- Ávalos, A., E. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario de plantas. REDUCA. 2(3):119-145.
- Beckmann, M., D. Parker, D.P. Enot, E. Duval, J. Draper. 2008. High-throughput, nontargeted metabolite fingerprinting using nominal mass flow injection electrospray mass spectrometry. NAT PROTOC. 3(3):486-504.
- Brown, L., J. Wolf, R. Prados-Rosales, A. Casadevall. 2015. Through the Wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. NAT REV MICROBIOL. 13:620-630.
- Cantrell, C., S. Franzblau, N. Fischer. 2001. Antimycobacterial plant terpenoids. PLANTA MED. 67:685-694.
- Carvajal, Z., L. Ramírez, M. Ducurú, V. Gómez, G. Cabrera, J. Méndez, M. Rodríguez. 2013. Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano. REV SOC VENEZOL MICROBIOL. 33(1):35-39.
- Chain, E., H. Florey, A. Gardner, N. Heatley, M. Jennings, J. Orr-Ewing, A. Sanders. 1940. Penicillin as a chemotherapeutic agent. THE LANCET. 236(6104):226-228.
- Chen, Y., S. Knabel. 2007. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. APPL ENVIRON MICROB. 73(19):6299-6304.
- Cortés, J. 2005. Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo. Tesis (Licenciatura). Hidalgo, México. Universidad autónoma del Estado de Hidalgo. 126 p.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. CLIN MICROBIOL REV. 12(4):564-582.
- Crawford, C., H. Hill. 2013. Evaluation of false positive responses by mass spectrometry and ion mobility spectrometry for the detection of trace explosives in complex samples. ANAL CHIM ACTA. 795:36-43.

- Cushnie, T., B. Cushnie, A. Lamb. 2014. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. INT J ANTIMICROB AG. 44(5):377-386.
- Delaquis, P., K. Stanich, B. Girard, G. Mazza. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, *coriander* and *eucalyptus* essential oils. INT J FOOD MICROBIOL. 74(1-2):101-109.
- De Mendiburu, F. 2009. Una herramienta de analisis estadistico para la investigacion agrícola. Tesis (Maestría en Ingenieria en Sistemas). Lima, Perú. Universidad Nacional de Ingenieria. 248 p.
- Djerassi, C., W. Krakower, A. Lemin, L. Liu, J. Mills, R. Villotti. 1958. The Neutral constituents of the cactus *Lophocereus schottii*. The structure of Lophenol--4 α -Methyl- Δ^7 -cholesten-3 β -ol--A Link in Sterol Biogenesis1-3. J AM CHEM SOC. 80(23):6284-6292.
- Domadia, P., A. Bhunia, J. Sivaraman, S. Swarup, D. Dasgupta. Berberine Targets Assembly of *Escherichia coli* Cell Division Protein FtsZ. BIOCHEMISTRY. 47(10):3225-3234.
- Eliopoulos, G., L. Maragakis, T. Perl. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial Resistance, and treatment options. CLIN INFECT DIS. 46(8):1254-1263.
- Encarnación, R. 2005. Medicina tradicional, una fuente potencial de los recursos naturales de baja california con interés biomédico y agroquímico. 14 p.
- Encarnación, R. 1996. Medicina Tradicional y Popular de Baja California Sur. Secretaria de Educación Pública. Primera Edición. La Paz, B.C.S., México. 123p.
- Encarnación, R., J. Agúndez, A. García, G. Delgado, G. Molina, S. Said. 2006. Two new casane-typediterpenes from *Calliandra californica* with antituberculosis and cytotoxicactivities. PLANTA MED. 72:757-761.
- Encarnación, R., S. Keer. 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. J ETHNOPHARMACOL. 31:181-192.
- Encarnación, R. C. Nogueiras, V. Salinas, U. Anthoni, P. Nielsen, C. Christophersen. 1999. Isolation of Eriodictyolidentical with Huazhongilexone from *Solanum hindsianum*. ACTA CHEM SCAND. 53:375-377.
- Encarnación, R., M. Virgen, N. Ochoa. 1998. Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). PHARM BIOL. 36(1):33-43.

- Faizi, S., R. Khan, S. Azher, S. Khan, S. Tauseef, A. Ahmad. 2003. New antimicrobial Alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. PLANTA MED. 69(4):350-355.
- Fratamico, P., S. Sackitey, M. Wiedmann, M. Deng. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J CLIN MICROBIOL. 33(8):2188-2191.
- Garcia-Flores, M., S. Juarez-Colunga, J. Montero-Vargas, J. Lopez-Arciniega, A. Chagolla, A. Tiessen, R. Winkler. 2012. Evaluating the physiological state of maize (*Zea mays* L.) plants by direct-injection electrospray mass spectrometry (DIESI-MS). MOL BIOSYST. 8:1658-1660
- García-Flores, M. S. Juarez-Colunga, A. García-Casarrubias, S. Trachsel, R. Winkler, A. Tiessen. 2015. Metabolic profiling of plant extracts using Direct-Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry allows for High-Throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. J AGR FOOD CHEM. 63(3):1042-1052.
- González, A. 2002. Toxicidad por metanol y su efecto sobre las vías visuales. VITAE: AC BIOMED DIG. 12:1-6.
- Hegnauer, R. 1989. Euphorbiaceae. En: Hegnauer, R. (ed.) Chemotaxonomie der pflanzen. Editorial Springer Basel AG. Basel, Suecia. Primera Edición. pp 440-473.
- Hemavani, C., B. Thippeswamy. 2012. Evaluation of antimicrobial activity of root extract of *Asclepias curassavica*. REC RES SCI THEC. 4(1):40-43.
- Igbinosa, O., E. Igbinosa, O. Aiyegoro. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). AFR J PHARM PHARMACO. 3(2):58-62.
- ILDIS World Database of Legumes 2014. <http://www.catalogueoflife.org/col/details/database/id/15>. Fecha de acceso: 15 de agosto, 2017.
- IMSS. 2014. Breviario para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F. 254p.
- Jackson, A., A. Tata, C. Wu, R. Perry, G. Haas, L. West, G. Cooks. 2009. Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. ANALYST. 134(5):809-1012.

- Jassbi, K. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia from Iran. PHYTOCHEMISTRY. 67(18):1977-1984.
- Karimi, A., M. Moradi. 2015. Total phenolic compounds and in vitro antioxidant potential of crude methanol extract and the correspond fractions of *Quercus brantii* L. acorn. J HERBMED PHARMACOL. 4(1):35-39
- Karon, M., E. Freireich, E. Frei. 1962. A preliminary report on vincristine sulfate—a new active agent for the treatment of acute leukemia. PEDIATRICS. 30(5):791-796.
- Kircher, H. 1969. The distribution of sterols, alkaloids and fatty acids in senita cactus, *Lophocereus schottii*, over its range in Sonora, Mexico. PHYTOCHEMISTRY. 8(8):1481-1488.
- Koczulla, A., R. Bals. 2003. Antimicrobial Peptides Current Status and Therapeutic Potential. DRUGS. 63(4):389-406.
- Lian, G., B. Yu. 2010. Naturally occurring dimers from chemical perspective. CHEM BIOD. 7(11):2660-2691.
- Liu, Y., Y. Wang, T. Walsh, L. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Yian, B. Dong, X. Huang, L. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Liv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J. Liu, J. Shen. 2015. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. LANCET INFECT DIS. 16(2):161-168.
- Magiorakos, A., A. Srinivasan, R. Carey, Y. Carmeli, M. Falagas, C. Giske, S. Harbarth, J. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-liljequist, D. Paterson, L. Rice, J. Stelling, M. Struelens, A. Vatopoulos, J. Weber, D. Monnet. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. CLIN MICROBIOL INFECT DIS. 18(3):268-281.
- Martínez, K., J. Jimenez, C. Mateo, L. Barbo, R. Rosas, A. Duran, O. Nieto, E. Barbosa, M. Rodriguez, M. Canales. 2015. Evaluation of the medicinal properties of *Cyrtocarpa procera* Kunth, fruit extracts. BMC COMPLEM ALTERN M. 15:74.
- MassBank©. <http://www.massbank.jp/PeakSearch.html> Fecha de acceso: 03 de marzo, 2018.

- Mazzuca, M., W. Kraus, V. Balzaretto. 2003. Evaluation of the Biological Activities of Crude Extracts from Patagonian *Prosopis* Seeds and Some of Their Active Principles. J HERB PHARMA. 3(2):31-37.
- Mendoza, L., M. Wilkens, A. Urzúa. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). J ETHNOPHARM. 58(2):85-88.
- Meyer, B., N. Ferrigni, J. Putnam, L. Jacobsen, D. Nichols, J. McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. PLANTA MED. 45(5):31-34.
- Montesinos, E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. FEMS MICROBIOL LETT. 270(1):1-11
- Morales, M., J. Verde, A. Oranday, C. Rivas, K. Arévalo, F. Treviño, P. Carranza, D. Cruz. 2007. Actividad biológica de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose. En: Congreso Nacional de Química Médica (2°, 2007, Monterrey, N.L. México). Monterrey, N.L. UANL. pp. 1-3.
- Moreno, M., R. González, C. Beltrán. 2009. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. REV OTORRINOLARINGOL CIR CABEZA CUELLO. 69:185-192.
- Moudi, M., R. Go, C. Y. S. Yien, M. Nazre. 2013. Vinca Alkaloids. INT J PREV MED. 4(11):1231-1235.
- Murillo, J., R. Encarnación, S. Franzblau. 2001. Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). PHARM BIOL. 39(6):445-449.
- Murillo, J. 2003. Compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica aislados de recursos naturales de Baja California Sur, México. Tesis (Doctorado en Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales). La Paz, B.C.S., México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 42 p.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2013. Clinical and Laboratory Standards Institute. 59 p.
- Nawrot, R., J. Barylski, J. Nowicki, J. Broniarczyk, W. Buchwald, A. Gozdicka. 2014. Plant antimicrobial peptides. FOLIA MICROBIOL. 59:181-196.
- Nothias, L., R. Knight, P. Dorrestein. 2016. Antibiotic discovery is a walk in the park. P NATL ACAD SCI USA. 113(51):14477-14479.

- Olaechea, P., J. Insausti, A. Blanco, P. Luque. 2009. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. MED INTENSIVA. 34(4):256-267.
- Olaleye, M. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. J MED PLANT RES. 1(1):009-013.
- Odhiambo, R., P. Kareru, H. Kulima, G. Nyagah, K. Njunge, W. Wamburu, K. Cheruiyot. 2015. Antibacterial activity of ethanolic extracts of *Prosopis juliflora* against gram negative bacteria. EUR J EXP BIOL. 5(11):43-46.
- Orozco-Barocio, A., B. Paniagua, P. Benítez, E. Flores, S. Velázquez, H. Arreola. 2013. Cytotoxic effect of the ethanolic extract of *Lophocereus schottii*: A Mexican medicinal plant. AFR J TRADIT COMPLEM. 10(3):397-404.
- Pandey, R., A. Mishra. 2010. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. APPL BIOCHEM BIOTECH. 160(5):1356-1361.
- Paredes, F. J. Roca. 2004. Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. Offarm: FARM SOC. 23(3):116-124.
- Pettit, G., R. Tan, G. Bao, N. Melody, D. Doubek, S. Gao, J. Chapus, L. Williams. 2012. Antineoplastic Agents. 587. Isolation and Structure of 3-Epipancreatistatin from *Narcissus cv. Ice Follies*. J NAT PROD. 75(4):771-773.
- Protección civil. 2007. Hoja de Seguridad 13. Hexano. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/13hexano.pdf> . Fecha de acceso: 29 de noviembre, 2016.
- Rajeh, M., Z. Zuraini, S. Sasidharan, L. Latha, S. Amutha. Assessment of *Euphorbia hirta* L. Leaf, Flower, Stem and Root Extracts for Their Antibacterial and Antifungal Activity and Brine Shrimp Lethality. MOLECULES. 15(9):6008-6018.
- Rojas, M., Y. Sánchez, Y. Abreu, I. Espinosa, T. Correa, O. Pino. 2012. Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. REV PROTECCIÓN VEG. 27(2):130-134.
- Rzedowski, J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México, en T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, UNAM, México. pp. 129-145.

- Sasidharan, S., Y. Chen, D. Saravanan, K. Sundram, L. Yoga. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant extracts. *AFR J TRADIT COMPLEM.* 8(1):1-10.
- Schwieger, F., C. Tebbe. 1998. A New Approach to Utilize PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *APPL ENVIRON MICROBIOL.* 64(12):4870-4876.
- Strommenger, B., C. Kettlitz, G. Werner, W. Witte. 2003. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *J CLIN MICROBIOL.* 41(9):4089-4094.
- Talaty, N., Z. Takáts, G. Cooks. 2005. Rapid *in situ* detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *ANALYST.* 130(12):1624-1633.
- Thong, K., M. Lai, C. Teh, K. Chua. Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR. *TROP BIOMED.* 28(1):21-31.
- Tolstikova, T., O. Sorokina, G. Tolstikov, A. Tolstikov, O. Flekhter. 2006. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. Semisynthetic lupane derivatives. *RUSS J BIOORG CHEM.* 32(3):261-276.
- Tu, Y. 2011. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *NAT MED.* 17:1217-1220.
- Turton, J., N. Woodford, J. Glover, S. Yarde, M. Kaufmann, T. Pitt. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *J CLIN MICROBIOL.* 44(8):2974-2976.
- Wehrens, R. 2011. *Chemometrics with R - Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences.* Springer. Primera Edición. Heidelberg, Alemania. 286p.
- WHO media centre. 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html> Fecha de acceso: 25 de junio, 2017.
- WHO media centre. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> Fecha de acceso: 25 de junio, 2017.

- Yasunaka, K., F. Abe, A. Nagayama, H. Okabe, L. Lozada, E. Lopez, E. Estrada, A. Aguilar, R. Reyes. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J ETHNOPHARM.* 97:293-299.
- Yount, N., M. Yeaman. 2013. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *ANN NY ACAD SCI.* 1277(1):127-138.

11. ANEXOS

Anexo A) Código utilizado para el análisis de iones.

Establecer directorio de trabajo

```
DirInput="path/to/file/"
setwd(DirInput)
```

Importacion de datos

```
filelist = dir(pattern="*.TXT")
msdata=data.frame(sample=1, mz=2,intensity=3, Scan=1, ionization=1)

for(i in 1:length(filelist)) {
  importeddata = read.table(file=filelist[i], skip=17, comment.char = "R"
, strip.white = TRUE)
  colnames(importeddata)=c("mz","intensity")

  importeddata$Scan="NA"
  importeddata$ionization="NA"

  idx.F=which(importeddata$mz=='FUNCTION')
  idx.F[length(idx.F)+1] = length(importeddata$mz)
  idx.S=which(importeddata$mz=='Scan')
  idx.S[length(idx.S)+1] = length(importeddata$mz)

  for(k in 1:(length(idx.F)-1)){

    importeddata$Scan[idx.S[k]:(idx.S[k+1])]=importeddata$intensity[idx.S
[k]]
    importeddata$ionization[idx.F[k]:(idx.F[k+1])]=importeddata$intensity
[idx.F[k]]
  }

  idx.F=which(importeddata$mz=='FUNCTION')
  importeddata=importeddata[-idx.F,]
  idx.S=which(importeddata$mz=='Scan')
  importeddata=importeddata[-idx.S,]

  msdata=droplevels(msdata)
  sample=rep(filelist[i], nrow(importeddata))
  sample=substr(sample, start=1, stop=(nchar(filelist[i])-4))
  importeddata=cbind(sample, importeddata)
  msdata=rbind(msdata,importeddata)
}
```


Edicion de formato de datos

```

msdata=msdata[-1,]
rm(importeddata)
msdata=droplevels(msdata)
msdata$mz=as.numeric(as.character(msdata$mz))
msdata$ionization=as.numeric(as.character(msdata$ionization))

summary(msdata)

msdata$entry=as.factor(substr(msdata$sample, start=10, stop=12))
msdata$condition=as.factor(substr(msdata$sample, start=13, stop=14))
msdata$entrycondition=as.factor(paste(msdata$entry, msdata$condition, sep
=""))

msdata$mz<-round(msdata$mz, digits=2)
idx.p<-which(msdata$ionization<10)
idx.n<-which(msdata$ionization>9)
msdata$mz[idx.n]<-abs(msdata$mz[idx.n])*-1

msdata$AproxMass<-round(msdata$mz*5)/5

msdata$ResidualMass<-msdata$mz-trunc(msdata$mz)
msdata$ResidualMass<-round(msdata$ResidualMass, digits=2)
msdata$ShiftedMass<-msdata$mz-msdata$AproxMass
msdata$AproxMass<-as.factor(msdata$AproxMass)

```

Elaboracion de Boxplots

```

boxplot(msdata$intensity~msdata$entrycondition, cex.axis=0.8, col=c(2,3))

ColorPal=c(2,2,2,5,5,5,6,6,6)
pdf(file="Ionization.pdf")
layout(matrix(c(1), 1, 1, byrow = TRUE))
par(mar=c(5,4,3,1), oma=c(1,1,1,1))
for(i in -150.2:400.2){
  try({
    BXP=boxplot(msdata$intensity[msdata$AproxMass==i]~msdata$ionization[m
sdata$AproxMass==i], cex.axis=1, las=2, col=ColorPal, main=paste("Segment
ed mz", i, sep=" "))
  } , silent=TRUE)
}
graphics.off()

msdata=msdata[-which(msdata$ionization==1),]
msdata=msdata[-which(msdata$ionization==2),]
msdata=msdata[-which(msdata$ionization==3),]

```

```
msdata=droplevels(msdata)

mzspace=aggregate(msdata$intensity, list((round(msdata$mz*5)/5)), mean)
names(mzspace)=c("mz", "intensity")
```

Selección de iones representativos

```
library(ChemometricsWithR)

v = pick.peaks(mzspace[,2], 3)
SelectedPeaks=mzspace[v,1]
nrow(mzspace)
length(SelectedPeaks)

X=c(80,90)
Y=c(0,200000000)
plot(mzspace[,2]~mzspace[,1], pch=2, xlim=X, ylim=Y, cex=0.6, col=3)
abline(v = pick.peaks(mzspace[,2], 3), col = "blue")

msdata=msdata[round(msdata$mz, digits=1) %in% SelectedPeaks,]

ColorPal=c(2,3)

i = 30.2
```

Análisis de varianza y comparaciones pareadas (Tukey)

```
library(agricolae)

MassCentroid=round(median(msdata$mz[msdata$AproxMass==i]), digits = 2)
boxplot(msdata$intensity[msdata$AproxMass==i]~msdata$entrycondition[msdata$AproxMass==i], cex.axis=1, las=2, col=ColorPal, notch=F, main=paste("Intensity mz", MassCentroid, sep=" "))

intensity=msdata$intensity[msdata$AproxMass==i]
entrycondition=msdata$entrycondition[msdata$AproxMass==i]
model1=aov(intensity~entrycondition)
df=df.residual(model1)
MSerror=deviance(model1)/df
comparison = LSD.test(intensity,entrycondition,df,MSerror, p.adj="bonferroni", group=TRUE)
BXPMEANS=data.frame(comparison$means)
BXPGROUPS=data.frame(comparison$groups)
BXPGROUPS=BXPGROUPS[order(BXPGROUPS$trt), ]
ngroups=length(BXPGROUPS$M)
text(x=1:ngroups, y=max(msdata$intensity[msdata$AproxMass==i]), BXPGROUPS$M, cex=0.8)

ColorPal=c(2,3)
```

```
pdf(file="Results_BoxplotsHeatmap_SelectedPeaksentryExtractNNN.pdf")

layout(matrix(c(1), 1, 1, byrow = TRUE))
par(mar=c(5,4,3,1), oma=c(1,1,1,1))

Ionmatrix=matrix(0,nrow=length(SelectedPeaks),ncol=nlevels(msdata$entrycondition))
colnames(Ionmatrix)=levels(msdata$entrycondition)

rownames(Ionmatrix)=SelectedPeaks
j=1

for(i in SelectedPeaks){
  try({
    MassCentroid=round(median(msdata$mz[msdata$AproxMass==i]), digits = 2)
  )
  BXP=boxplot(msdata$intensity[msdata$AproxMass==i]~msdata$entrycondition[msdata$AproxMass==i], cex.axis=1, las=2, col=ColorPal, main=paste("Intensity mz", MassCentroid, sep=" "))
  BM=data.frame(BXP$stats)
  Ionmatrix[j,]=unlist(BM[3,])
  j=j+1
} , silent=TRUE)
}
mode(Ionmatrix)="numeric"
round(min(Ionmatrix, na.rm = TRUE),0)
Ionmatrix[is.na(Ionmatrix)] <- 600
```

Definición de funciones para calcular distancia para los dendogramas

```
cor.dist <- function(x){ as.dist(1- cor(t(x), use="pairwise.complete.obs"))}
cor2.dist <- function(x){ as.dist(1- cor(t(x), use="pairwise.complete.obs")^2)}

hv <- heatmap(log(Ionmatrix[1:nrow(Ionmatrix),]), distfun=cor.dist, col = gray(24:0/24), scale="row", main=paste("logscaled R 1-", nrow(Ionmatrix), sep = ""))
plot(hclust(cor.dist(t(log(Ionmatrix[1:nrow(Ionmatrix),])))))

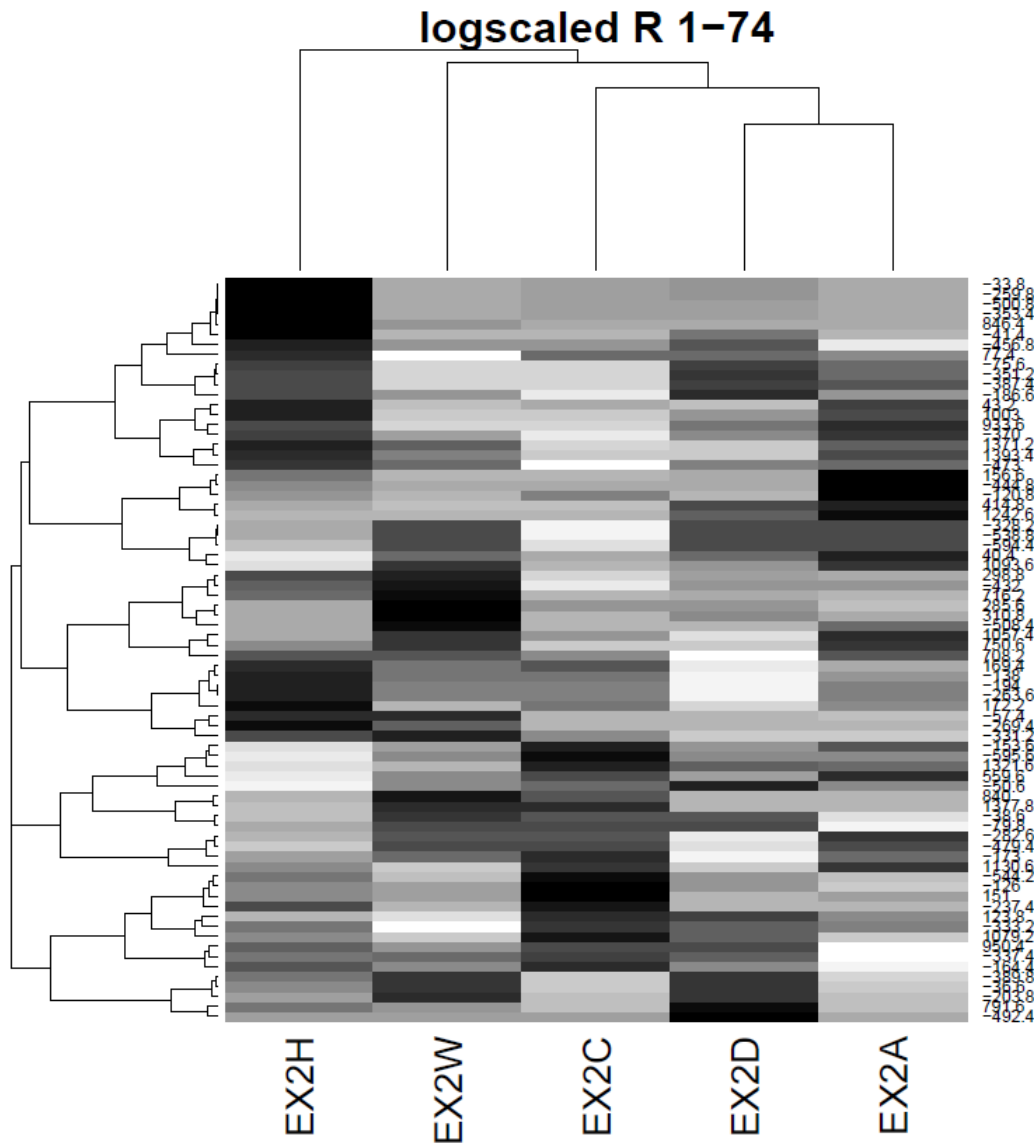
graphics.off()

write.table(Ionmatrix, "clipboard", sep="\t")
```

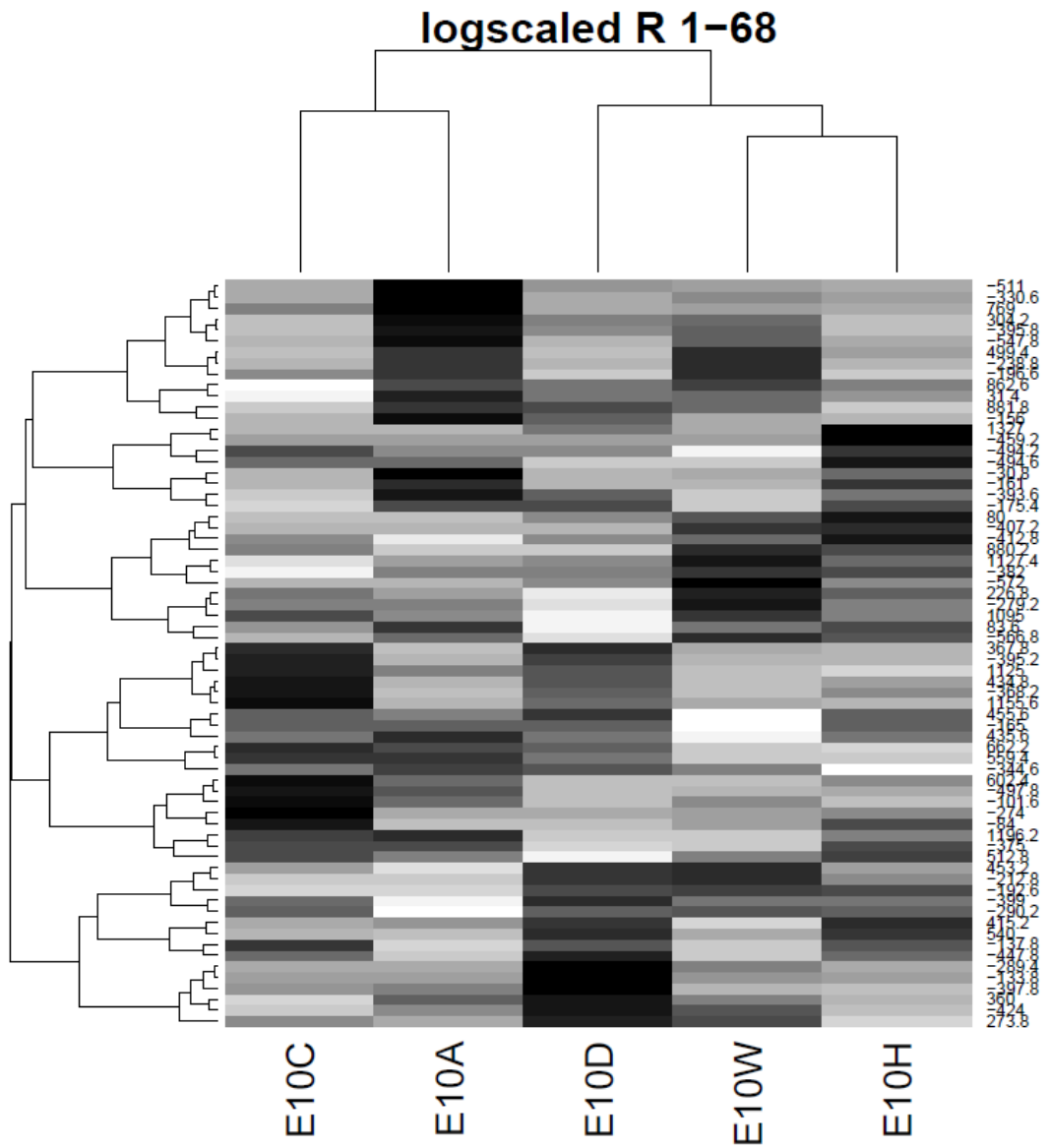
DATA EXPORT /IMPORT

```
save.image(file = "massRSegmented.Rdata")
```

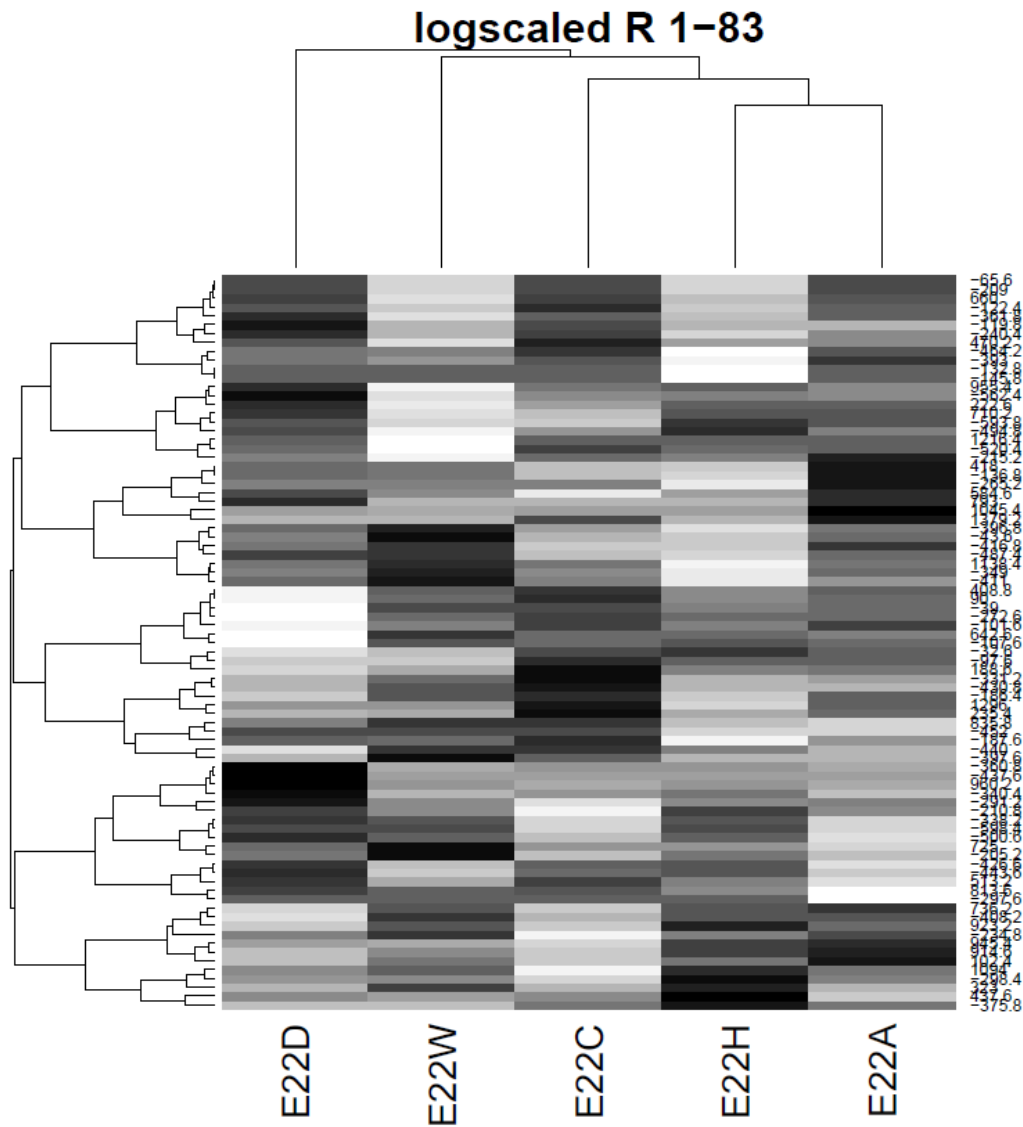
Anexo B) Iones del 1-74 del extracto Ex2 (*Prosopis articulata*). Se muestran los dendogramas, los cuales representan la similitud entre las fracciones (por columna), y entre los iones (por renglón). Los valores se encuentran centrados y escalados en dirección de fila.



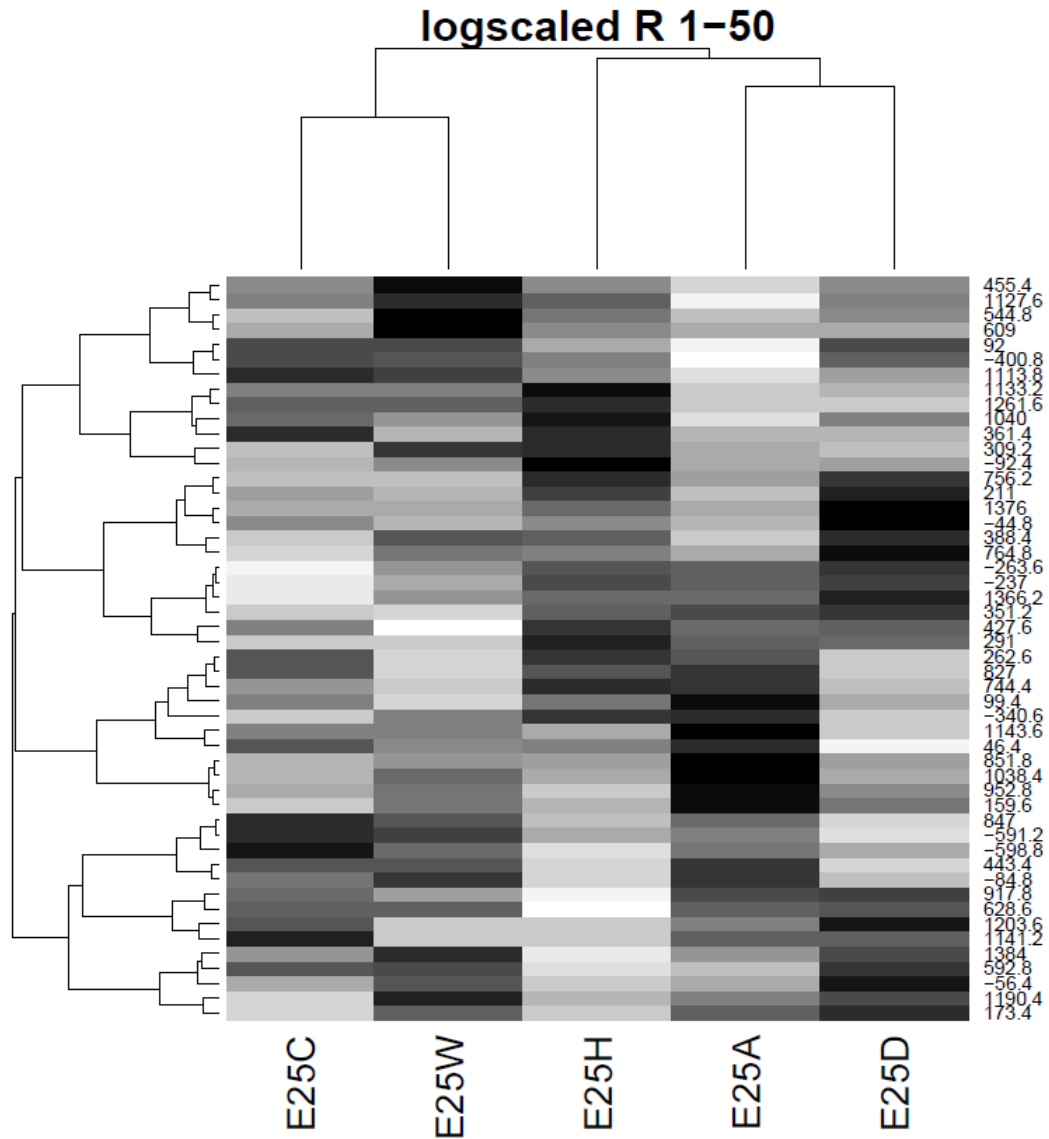
Anexo C) Iones del 1-68 del extracto Ex10 (*Lysiloma candida*). Se muestran los dendogramas, los cuales representan la similitud entre las fracciones (por columna), y entre los iones (por renglón). Los valores se encuentran centrados y escalados en dirección de fila.



Anexo D) Iones del 1-83 del extracto Ex22 (*Lophocereus schottii*). Se muestran los dendogramas, los cuales representan la similitud entre las fracciones (por columna), y entre los iones (por renglón). Los valores se encuentran centrados y escalados en dirección de fila.



Anexo E) 1.- Iones del 1-50 del extracto Ex25 (*Euphorbia sp.*). Se muestran los dendogramas, los cuales representan la similitud entre las fracciones (por columna), y entre los iones (por renglón). Los valores se encuentran centrados y escalados en dirección de fila.



Anexo E) 2.- Iones del 51 al 100 del extracto Ex25 (*Euphorbia* sp.). Continuación.

