



# Universidad de la Sierra Sur

Búsqueda de actividad antimicrobiana de plantas de  
la Sierra Sur del estado de Oaxaca contra  
*Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Trichophyton  
rubrum*

TESIS

Para obtener el título de:  
Maestra en Salud Pública

Presenta:

**Gloria Rubí Sánchez Hernández**

Bajo la dirección de:

Dr. Nemesio Villa Ruano

Co-dirección de:

Dr. Clemente Mosso González

Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, Julio 2018.

Fecha: \_\_\_\_\_

Presidente: Dra. María Alejandra Sánchez Bandala

Secretario: Dr. Hady Keita

Vocal: Dr. Nemesio Villa Ruano

Suplente: Dr. Sergio Alberto Ramírez García

Suplente: M.C. Horacio Duque Bautista

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser el padre que no me suelta de la mano, por ser la fuerza que me motiva a no desfallecer en los momentos más difíciles.

Dedico esta tesis a mi madre, por ser la persona que más admiro, quien ha estado presente en todo momento que he necesitado, por escucharme y tener siempre las palabras que reconfortan mi ser.

A Elí Israel, por ser el motor y la razón que me llena de alegría para luchar y seguir adelante, te amo hijo!

A mis hermanos, por cada una de las palabras de motivación para no rendirme.

A la memoria de Modesto Sánchez Ramírez.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de la Sierra Sur (UNSSIS) por ser la institución que acobijó mi estancia de posgrado

Al Dr. Nemesio Villa Ruano mi más amplio agradecimiento por haber confiado en este trabajo, por la paciencia, su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo

A mi comité tutorial Dr. Clemente Mosso González, M.C.S. José Isaías Síliceo Murrieta, M.C. Quilibaldo Gabriel Zurita Vásquez, por cada una de las observaciones y compartir sus conocimientos para el desarrollo de la tesis

A mi familia (mamá, hijo, hermanos, sobrinos, cuñadas, tíos, primos, etc.) por la comprensión y el amor incondicional que tienen en todo momento a pesar de la distancia

Gracias a mis amigos y todas aquellas personas que aparecieron en mi vida, durante esta travesía. Gracias por su apoyo, ánimo y compañía, sin importar en donde se encuentren los llevo en mis recuerdos y en el corazón.

Las palabras nunca serán suficientes para externar mi agradecimiento

¡GRACIAS!

## RESUMEN

Actualmente la incidencia de infecciones por diversos microorganismos ha aumentado de manera considerable en la población rural del estado de Oaxaca y cada día existen nuevos retos debido a la aparición de cepas que generan una resistencia rápida a los antimicrobianos de rutina, por ello existe un gran interés en la búsqueda de nuevos productos en los recursos etnobotánicos regionales que permitan validar el uso de algunas plantas usadas comúnmente. El objetivo fue evaluar los extractos hidroetanólicos y aceites esenciales de al menos 5 plantas con uso medicinal de la Sierra Sur, para el biocontrol de microorganismos. Se recolectó *Rhus chondoloma* (azomaque), *Montanoa tomentosa* (zoapatle), *Salmea scandens* (palo de chile), *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* (poleo), *Azardachta indica* (Neem), *Solanum erianthum* (hoja de Espino), *Lantana camara* (frutillo), *Croton ciliatoglandulifer* (Xonaxe) y *Lantana hirta*, en la población de Miahuatlán de Porfirio Díaz. Muestras frescas de hojas y tallos se extrajeron con etanol (96°). Los extractos hidroetanólicos se filtraron, concentraron y finalmente se redujeron a sequedad bajo un flujo de N<sub>2</sub>. Las cepas que se utilizaron fueron *Escherichia coli* (PIR 2), *Candida albicans* (ATCC-90028) y *Trichophyton rubrum* (AAC-UNAM) donadas por la UNAM. El método para buscar actividad antimicrobiana fue de difusión en agar y difusión en disco, midiendo el halo de inhibición. De los extractos etanólicos solamente dos de ellos mostraron un efecto de inhibición, uno para la cepa de *E. coli* y *T. rubrum* en cuanto a *C. albicans* ninguno de los extractos mostraron efecto inhibitorio. Los resultados obtenidos al identificar, aislar y purificar los principios activos, aportan evidencia del uso tradicional de *Rhus chondoloma* (azomaque), *Croton ciliatoglandulifer* (Xonaxe) y *Lantana hirta*.

## PALABRAS CLAVE

Salud pública, Plantas medicinales, resistencia antimicrobiana, microorganismos

## ABSTRACT

Currently the incidence of infections by various microorganisms has increased considerably in the rural population of the state of Oaxaca and every day there are new challenges due to the emergence of strains that generate rapid resistance to routine antimicrobials, so there is great interest in the search of new products in the regional ethnobotanical resources that allow to validate the use of some commonly used plants. The objective was to evaluate the hydroethanolic extracts and essential oils of at least 5 medicinal plants of the Sierra Sur, for the biocontrol of microorganisms. It was collected *Rhus chondoloma* (azomaque), *Montanoa tomentosa* (zoapatle), *Salmea scandens* (palo de chile), *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* (poleo), *Azardachta indica* (Neem), *Solanum erianthum* (hoja de Espino), *Lantana camara* (frutillo), *Croton ciliatoglandulifer* (Xonaxe) y *Lantana hirta* in the town of Miahuatlán de Porfirio Díaz. Fresh samples of leaves and stems were extracted with ethanol (96 °). The hydroethanolic extracts were filtered, concentrated and finally reduced to dryness under a flow of N<sub>2</sub>. The bacterial strains that were used were *Escherichia coli* (PIR 2), *Candida albicans* (ATCC-90028) y *Trichophyton rubrum* (AAC-UNAM) donated by the UNAM. The method to look for antimicrobial activity was diffusion in agar and disc diffusion, measuring the inhibition halo. Of the ethanolic extracts only two of them showed an inhibition effect, one for the *E. coli* strain and *T. rubrum* for *C. albicans* none of the extracts showed inhibitory effect. The results obtained by identifying, isolating and purifying the active ingredients, provide evidence of the traditional use of *Rhus chondoloma* (azomaque), *Croton ciliatoglandulifer* (Xonaxe) and *Lantana hirta*.

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Resistencia microbiana.....	4
1.3. Mecanismos de las bacterias para adquirir resistencia antimicrobiana.....	5
1.4. Microorganismos causantes de problemas de salud pública.....	6
1.4.1. <i>Trichophyton rubrum</i> .....	6
1.4.2. <i>Candida albicans</i> .....	7
1.4.3. <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.5. Objetivo General.....	12
1.6. Objetivo particulares.....	12
1.7. Justificación.....	13
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO).....	15
2.1. Concepto de salud pública y su investigación.....	15
2.2. Plantas medicinales y salud pública.....	18
2.3. Método de determinación de actividad antibacteriana con plantas medicinales en ensayos de difusión en agar.....	25

2.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el Método de Microdilución Colorimétrico con Resazurina en microplaca.....	31
2.5. Análisis de Datos.....	34
2.6. Metodologías analíticas para la purificación de principios activos.....	35
2.7. Cromatografía en placa fina.....	37
2.8. Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS)...	39
2.9. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	41
CAPÍTULO 3. METODOLOGIA.....	41
3.1. Material vegetal.....	41
3.2. Preparación de los extractos.....	42
3.3. Obtención de los aceites esenciales.....	42
3.4. Microorganismos.....	42
3.5. Método de determinación de actividad antibacteriana ensayos de difusión en agar con los extractos etanólicos.....	43
3.5.1. Preparación del Inóculo.....	43
3.6. Escrutinio preliminar de extractos etanólicos para determinar la sensibilidad de los microorganismos estudiados.....	43
3.7. Siembra del inóculo en las placas.....	44
3.8. Método de determinación de actividad antibacteriana por técnica de	44



microdilución en caldo.....	
3.9. Preparación del Inóculo.....	44
3.10. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por el método de microdilución colorimétrico en microplaca.....	45
3.11. Cromatografía en Placa Fina.....	45
3.12. Separación y análisis de fracciones por HPLC.....	46
3.13. Análisis por GC-MS.....	46
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	47
4.1. Efecto antimicrobiano sobre <i>Escherichia coli</i> .....	48
4.1. Efecto antimicrobiano sobre <i>Candida albicans</i> .....	52
4.2. Efecto antimicrobiano sobre <i>Trichophyton rubrum</i> .....	60
4.3. Separación e identificación de los analitos con actividad antimicrobiana....	62
4.4. Perfil químico de los aceites esenciales.....	67
CAPÍTULO 5. ANÁLISIS, DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	73
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	79
6.1. RECOMENDACIONES.....	80
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS.....	81

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1.</b> Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	5
<b>Imagen 2.</b> Cultivo macroscópico de <i>Trichophyton rubrum</i> en estría cruzada e imagen microscópica observada con objetivo de 100x.....	7
<b>Imagen 3.</b> Cultivo macroscópico en estría cruzada e imagen microscópica de <i>Candida albicans</i> observada con un objetivo de 20x.....	9
<b>Imagen 4.</b> Cultivo macroscópico en forma de nube (siembra invasiva) e imagen microscópica de <i>Escherichia coli</i> observada con objetivo de inmersión de 100x.....	10
<b>Imagen 5.</b> Método de difusión con discos en el que se observa la presencia de halos de inhibición, lo que demuestra la inhibición del microorganismo.....	26
<b>Imagen 6.</b> Método de dilución en caldo, el cambio de coloración muestra el efecto de inhibición en el ensayo.....	27
<b>Imagen 7.</b> Ensayo antibacteriano basado en placa de microtitulación que incorpora resazurina como indicador del crecimiento celular y su aplicación en el cribado antibacteriano in vitro de fitoquímicos.....	32
<b>Imagen 8.</b> Ejemplo del ensayo con Resazurina, el crecimiento en el medio se indica por el cambio de coloración de azul a rosa.....	33
<b>Imagen 9.</b> Esquema de la cromatografía de capa fina.....	38
<b>Imagen 10.</b> Esquema de la cromatografía de capa fina.....	40
<b>Imagen 11.</b> (A) control de inhibición de crecimiento, B (control positivo de crecimiento), concentraciones evaluadas del extracto etanólico de <i>Rhus chondoloma</i> C (0.01 mg/ml), D (0.1 mg/ml), E (0.2 mg/ml) y F (0.4 mg/ml)....	48
<b>Imagen 12.</b> Concentraciones evaluadas del extracto etanólico de <i>Rhus chondoloma</i> G (0.6 mg/ml), H (0.8 mg/ml), I (1 mg/ml), J (1.2 mg/ml).....	49
<b>Imagen 13.</b> Se muestra una ANOVA con TUKEY entre las diferentes concentraciones (*p<0.01) y el porcentaje de crecimiento de <i>E coli</i> . La C+ corresponde al control positivo, el cuál no contiene ningún antibiótico.....	50
<b>Imagen 14.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>Rhus chondroloma</i> sobre crecimiento de <i>Escherichia coli</i> . Las concentraciones que se evaluaron	51

fueron de 0.5 hasta 6 mg/ml por el método de microdilución en caldo con resazurina.....	
<b>Imagen 15.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>Rhus chondroloma</i> sobre crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , por el método de microdilución en caldo con resazurina. La C+ corresponde al control positivo (sin antibiótico) y C- corresponde al control negativo (con antibiótico). Las concentraciones que se evaluaron fueron de 0.5 hasta 6 mg/ml respectivamente.....	52
<b>Imagen 16.</b> A (control positivo), B (control Fluconazol), C (control Terbinafina), diferentes concentraciones que se evaluaron del aceite esencial de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> D (0.65 mg/ml), E (0.975 mg/ml) y F (1.3 mg/ml).....	53
<b>Imagen 17.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> sobre crecimiento de <i>Candida albicans</i> . Las diferentes concentraciones que se evaluaron del aceite esencial de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> sobre crecimiento de <i>Candida albicans</i> . Los controles (C+) corresponden al crecimiento, no contiene ningún antifúngico y (C-) son los antifúngicos comerciales utilizados, Fluconazol y Terbinafina.....	54
<b>Imagen 18.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> sobre crecimiento de <i>Candida albicans</i> . Los controles de crecimiento y los negativos, así como las concentraciones que se evaluaron del aceite esencial.....	54
<b>Imagen 19.</b> Efecto de <i>Lantana hirta</i> sobre crecimiento de <i>Candida albicans</i> . A (control positivo), B (control terbinafina 4 mg/ml), diferentes concentraciones evaluadas del aceite esencial C (0.3 mg/ml), D (0.6 mg/ml), E (1.2 mg/ml) y F (2.5 mg/ml).....	56
<b>Imagen 20.</b> Efecto de <i>Lantana hirta</i> sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> . Las diferentes concentraciones mediante el ensayo de difusión en disco. A (1.2 mg/ml), B (2.5 mg/ml) y C (3.8 mg/ml), utilizando un vernier para conocer el tamaño del halo de inhibición.....	57
<b>Imagen 21.</b> Efecto de <i>Lantana hirta</i> sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> . Las diferentes concentraciones mediante el ensayo de	58

microdilución con resazurina. Las concentraciones que se evaluaron fueron de 0.5 hasta 8 mg/ml. A partir de la concentración de 5.5 mg/ml el efecto de inhibición fue nulo.....	
<b>Imagen 22.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Lantana hirta</i> sobre crecimiento de <i>Candida albicans</i> , ensayo con resazurina. Los diferentes controles positivo y negativo de crecimiento, el porcentaje de crecimiento de acuerdo a las concentraciones evaluadas.....	59
<b>Imagen 23.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>Rhus chondoloma</i> sobre crecimiento de <i>Trichophyton rubrum</i> con la técnica de ensayo de difusión en agar. A (control positivo), B (control terbinafina), C (control fluconazol), las diferentes concentraciones del extracto, D (0.01mg/ml) y F (0.2 mg/ml).....	60
<b>Imagen 24.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>Rhus chondoloma</i> sobre crecimiento de <i>Trichophyton rubrum</i> , correspondiente a las concentraciones G (0.4 mg/ml), H (0.6 mg/ml), I (0.8 mg/ml), J (1 mg/ml), K (1.2 mg/ml) y L (1.4 mg/ml).....	61
<b>Imagen 25.</b> De lado izquierdo se muestra la cámara cromatográfica con la placa fina y el extracto de <i>Rhus chondoloma</i> y de lado derecho la observación de la placa fina a 325 nm. En color rojo se observa la fracción de interés.....	62
<b>Imagen 26.</b> Cromatograma que muestra la abundancia de dos compuestos mayoritarios (3,5 dihidroxitolueno y 4-hidroxiacetofenona) en la fracción que fue separada por placa fina del extracto de <i>Rhus chondoloma</i> .....	63
<b>Imagen 27.</b> Efecto de 3,5 dihidroxitolueno (orcinol) sobre crecimiento <i>Trichophyton rubrum</i> y las diferentes concentraciones que se evaluaron. A (control positivo), B (control terbinafina), C (control fluconazol), D (0.01 mg/ml), E (0.1 mg/ml) y F (0.2 mg/ml).....	64
<b>Imagen 28.</b> Efecto de 3,5 dihidroxitolueno (orcinol) sobre crecimiento <i>Trichophyton rubrum</i> y las diferentes concentraciones. G (0.4 mg/ml), H (0.6 mg/ml), I (0.8 mg/ml) y J (1 mg/ml). Se aprecia que a partir de la concentración de 0.6 mg/ml ya no hubo crecimiento de <i>Trichophyton rubrum</i> .....	65

<b>Imagen 29.</b> Efecto de 4-hidroxiacetofenona sobre crecimiento <i>Trichophyton rubrum</i> A (0.01 mg/ml), B (0,1 mg/ml), C (0.2 mg/ml), D (0.4 mg/ml), E (0.6 mg/ml) y F (0.8 mg/ml).....	66
<b>Imagen 30.</b> Perfiles químicos por GC-MS del aceite esencial de las hojas de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> . A, aceite esencial de hojas colectadas en abril 2016.B, aceite esencial de hojas colectadas en junio 2016.....	68
<b>Imagen 31.</b> Perfiles químicos por GC-MS del aceite esencial de las hojas de <i>Lantana hirta</i> . A, aceite esencial de hojas colectadas en abril 2016.B, aceite esencial de hojas colectadas en junio 2016.....	71
<b>Imagen 32.</b> Perfiles químicos por GC-MS del aceite esencial de las hojas y flores de <i>Lantana hirta</i> . A, aceite esencial de hojas colectadas en abril 2016.B, aceite esencial de flores colectadas en junio 2016.....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Infecciones y agente causal aislado en la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica.....	19
Tabla 2. Conceptos de Salud Pública .....	23
Tabla 3. Funciones esenciales de la salud pública .....	25
Tabla 4. Publicaciones sobre los aportes de las especias, hierbas y plantas de medicina en salud. ....	28
Tabla 5. Ejemplos de investigaciones que se han realizado y el aporte para tratar problemas de salud pública .....	29
Tabla 6. Muestra las proteínas recombinantes que hoy se comercializan y se emplean como fármacos en humanos .....	31
Tabla 7. Algunas enzimas producidas como proteínas recombinantes en bacterias y en hongos genéticamente modificados, y que actualmente se usan en la industria alimenticia. ....	31
Tabla 8. Algunos ejemplos sobre la evaluación de principios activos de plantas o extractos crudos usando resazurina como indicador de viabilidad.....	40
Tabla 9. Clasificación de las técnicas cromatográficas .....	43

# INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de salud pública en la población es la resistencia a los antimicrobianos (RAM), la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) afirma que “el mundo se está quedando sin antibióticos, y existe una falta de nuevos antibióticos en fase de desarrollo, para combatir la amenaza de resistencia a los antimicrobianos”. Esto debido a que pone en peligro la eficacia, la prevención y el tratamiento de infecciones por bacterias, virus, hongos y parásitos. Prolonga la enfermedad, los tratamientos son más costosos y esto aumenta el costo a la atención sanitaria de los pacientes (OMS, 2016).

La RAM ha ido aumentando en todo el mundo, día con día aparecen nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, pues existen opciones terapéuticas que únicamente proporcionan soluciones en tiempos cortos y algunos son ineficaces para las infecciones causantes de morbi-mortalidad en la población.

Lo que es preocupante ya que los mecanismos de resistencia se propagan en todo el mundo, poniendo en peligro la salud y la capacidad de los servicios de salud para la atención de la población aumentando la discapacidad, la prolongación de la enfermedad y muertes.

Actualmente la OMS está trabajando la “Alianza Mundial para la Investigación y el Desarrollo de Antibióticos” la cual consiste en “fomentar la investigación y el desarrollo mediante colaboraciones público-privadas”. Para 2023, tiene como objetivo desarrollar y proporcionar hasta cuatro nuevos tratamientos mediante la mejora de los antibióticos existentes y la aceleración de la entrada de nuevos antibióticos (2017).

De acuerdo a lo anterior es de gran importancia la búsqueda de nuevas moléculas precursoras de fármacos para contrarrestar estos efectos de resistencia y dado que la mayoría de los medicamentos son derivados de productos naturales, principalmente de plantas, estas juegan un papel importante. El uso de plantas

medicinales es una relación estrecha entre el ser humano y la naturaleza desde siglos antes, la importancia hoy en día y en las últimas décadas son las numerosas investigaciones de las plantas medicinales, su manejo, la conservación y principalmente el uso medicinal o terapéutico que se atribuyen a las mismas.

En México se tienen las condiciones favorables para una gran variedad de plantas que en su mayoría se utilizan como tratamientos fitoterapéuticos. El resurgimiento en el uso de alternativas a base de plantas medicinales ha generado que se mantengan vigentes los estudios farmacológicos ayudando en el descubrimiento de nuevos fármacos (Munayco-Moromi, 2013). Tomando en consideración lo anterior, la importancia del trabajo es respaldar el conocimiento empírico aportando evidencia científica para el aprovechamiento de las plantas medicinales, ya que es una alternativa para mejorar la salud de la población, además de aportar aspectos fisicoquímicos y química de las plantas, con la finalidad de generar en un futuro, el uso racional de las plantas medicinales en medicamentos debidamente dosificados.