



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

LABORATORIO DE GLICOBIOLOGIA

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PLANTAS CON ACTIVIDAD
HEMAGLUTINANTE”

TESIS QUE PRESENTA
P.Q.F.B. ROSALIA TELLO BACA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTOR DE TESIS
D.C. BERTHA FENTON NAVARRO

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, Marzo 2009





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

“Actividad antibacteriana de plantas con actividad hemaglutinante”

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
P.Q.F.B. ROSALIA TELLO BACA

DIRECTOR DE TESIS
D.C. BERTHA FENTON NAVARRO

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, 2009



Este trabajo se realizó bajo la
Dirección de la D.C. Bertha Fenton
Navarro en el laboratorio de glicobiología
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y
Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"
UMSNH

Apoyado por:

COECYT- Michoacán

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada doy gracias a Dios por permitirme vivir cada día, con alegrías, tristezas, triunfos y derrotas, permitiéndome así disfrutar cada etapa de mi vida junto a las personas que mas amo en este mundo, hoy concluyendo esta etapa, tal vez la más importante te doy gracias al bendecirme por ver logrado mi mas grande sueño ser sin duda alguna una Química Fármaco bióloga.

A mis padres por que gracias a su amor incondicional, consejos, principios y sobre todo esfuerzo soy lo que soy, me han dado la herencia más grande que pudiera recibir, y por que a ellos les debo lo que soy.

A la D.C.Doctora Bertha Fenton Navarro por su apoyo, comprensión, paciencia y conocimientos y que gracias a ella he aprendido que el conocimiento es una visión total e instantánea de la realidad, así como también me enseñó a creer en mi misma.

A mis Amigas Itzel, Norma, Rosalinda y Yadira que sufrieron y estuvieron conmigo en los momentos más difíciles, apoyandome y brindandome los mejores consejos y sonrisas para empezar un nuevo día, por que gracias a ellas descubrí que siempre hay un nuevo día.

A mi Amigo Horacio por enseñarme todo lo que hasta ahora se de microbiología, sin su compañía y su buen humor el camino hubiera sido mucho más difícil y arduo. Gracias cha!!!

A mi Amigo Sergio por sus consejos y por estar ahí siempre que lo necesitaba

A Juan por su apoyo incondicional, siempre estando ahí cuando necesito ayuda, y sobre todo por su comprensión.

GRACIAS!!!!

INDICE GENERAL

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....	i
INDICE GENERAL.....	ii
INDICE DE TABLAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE ABREVIATURAS.....	vii
GLOSARIO DE TERMINOS.....	viii
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCION	
1. HISTORIA.....	2
Usos en la medicina tradicional.....	3
Enfermedades bacterianas que representan un problema de salud en México.....	4
2. LECTINAS	
Definición.....	6
Descripción.....	7
Método de detección y caracterización.....	7
Función.....	7
Clasificación.....	8
Lectinas en plantas.....	8
Lectinas en animales.....	10
Lectinas microbianas.....	12
Adhesinas microbianas y receptores glicoconjugados en la superficie celular.....	16
Adhesinas unidas a glicolípidos	17
Mecanismo de acción (infección).....	17
3. BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS.....	18
4. PLANTAS MEDICINALES	
Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	20

Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).....	22
Ruda (<i>Ruta graveolens</i>).....	23
Neem (<i>Azadirachta indica</i>).....	24
Flor de Manita (<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>).....	25
5. REPORTES DE USOS CON ACCIONES ANTIBACTERIANAS.....	26
6. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	27
II JUSTIFICACION.....	28
III HIPOTESIS.....	29
IV OBJETIVOS.....	29
A) General.....	29
B) Particulares.....	29
V MATERIAL.....	29
VI METODOS.....	30
VII RESULTADOS	
JAMAICA	
Actividad hemaglutinante.....	34
Actividad antibacteriana del extracto crudo y pigmentos (Kirby-Bauer).....	35
Análisis de aglutinación y número de bacterias.....	36
GOBERNADORA	
Actividad hemaglutinante.....	40
Actividad antibacteriana del extracto crudo y pigmentos (Kirby-Bauer).....	41
Análisis de aglutinación y número de bacterias.....	43
RUDA	
Actividad hemaglutinante.....	46
Actividad antibacteriana del extracto crudo y pigmentos (Kirby-Bauer).....	47
Análisis de aglutinación y número de bacterias.....	48
NEEM	
Actividad hemaglutinante.....	52
Actividad antibacteriana del extracto crudo y pigmentos (Kirby-Bauer).....	53
Análisis de aglutinación y número de bacterias.....	55

FLOR DE MANITA

Actividad hemaglutinante.....	58
Actividad antibacteriana del extracto crudo y pigmentos (Kirby-Bauer).....	59
Análisis de aglutinación y número de bacterias.....	61
VIII DISCUSION.....	65
IX CONCLUSIONES.....	70
X BIBLIOGRAFIA.....	72

INDICE DE TABLAS

NUMERO DE TABLA	PAG.
1. Función de la lectinas.....	8
2. Especificidad de bacterias por carbohidratos	12
3. Agrupación de diferentes bacterias que reconocen al mismo tipo de carbohidrato.....	13
4. Ejemplos de interacción de adhesinas bacterianas con glicanos.....	14
5. Ejemplo de receptores de glicosfingolípidos para toxinas bacterianas.....	15
6. Actividad del extracto crudo de Jamaica.....	34
7. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Jamaica.....	35
8. Actividad del extracto crudo de Gobernadora.....	40
9. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Gobernadora.....	42
10. Actividad del extracto crudo de Ruda.....	46
11. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Ruda.....	47
12. Actividad del extracto crudo de Neem.....	52
13. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Neem.....	53
14. Actividad del extracto crudo de Flor de Manita.....	58
15. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Flor de Manita.....	60

INDICE DE FIGURAS

NUMERO DE FIGURA

PAG.

1. Índice de enfermedades diarreicas.....	5
2. Interacción lectina-carbohidrato.....	16
3. Envoltura celular Grampositiva y Gramnegativa.....	19
4. Actividad específica del extracto crudo de Jamaica.....	35
5. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Jamaica.....	36
6. Actividad antibacteriana de los pigmentos de Jamaica.....	36
7. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Jamaica.....	38
8. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Jamaica.....	39
9. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Jamaica.....	39
10. Aglutinación de bacterias por lectinas de Jamaica.....	40
11. Actividad específica del extracto crudo de Gobernadora.....	41
12. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Gobernadora.....	42
13. Actividad antibacteriana de los pigmentos de Gobernadora.....	42
14. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Gobernadora.....	44
15. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Gobernadora.....	45
16. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Gobernadora.....	45
17. Actividad específica del extracto crudo de Ruda.....	47
18. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Ruda.....	48
19. Actividad antibacteriana de los pigmentos de Ruda.....	48
20. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Ruda.....	50
21. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Ruda.....	51
22. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Ruda.....	51
23. Actividad específica del extracto crudo de Neem.....	53
24. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Neem.....	54
25. Actividad antibacteriana de los pigmentos de Neem.....	54
26. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Neem.....	56
27. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Neem.....	57
28. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Neem.....	57
29. Aglutinación de bacterias por lectinas de Neem.....	58
30. Actividad específica del extracto crudo de Flor de Manita.....	59
31. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Flor de Manita.....	60
32. Actividad antibacteriana de los pigmentos de Flor de Manita.....	61
33. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Flor de Manita.....	62
34. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Flor de Manita.....	63
35. Aglutinación de bacterias por fracción proteica cetónica de Flor de Manita.....	63
36. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Flor de Manita.....	64

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µL	Microlitros
%	Porcentaje
°	Grados
°C	Grados Centígrados
Ac.	Acido
AcNeu	Acido neuramínico
AE	Actividad Específica
ATCC	American Type Culture Collection
C	Concentración
Ca	Calcio
CFU	Unidades Formadoras de Colonias
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
cm.	Centímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Extracto crudo
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FP	Fracción proteica
Fuc	Fucosa
g.	Gramos
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil-galactosamina
Glc.	Glucosa
GlcNAc	N-acetil- glucosamina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRA	Infecciones Respiratorias Agudas
Kg	Kilogramos
L	Litro
m	Metro
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
Mn	Manganeso
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanómetro
OH	Hidroxilo
OMS	Organización mundial de la salud
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tto.	Tratamiento
UHA	Unidades de Hemaglutinación

GLOSARIO DE TERMINOS

Actividad antibacteriana: Se presenta cuando el antimicrobiano logra inhibir una población bacteriana, esta puede medirse de forma cuantitativa mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos frente a patógenos concretos.

Afecciones: Anormalidad dañosa ó alteración de la salud.

Antibiótico: Son agentes antimicrobianos de uso sistémico que pueden reducir y controlar la presencia de microorganismos contaminantes del huésped y son administrados por ingestión oral, uso tópico: absorbidos por la piel o inyectados.

Antimicrobianos: Son sustancias químicas naturales, (sintetizadas por hongos o bacterias) sintéticas o semisintéticas que son capaces de inhibir el desarrollo o de destruir los microorganismos patógenos infectantes.

ATCC: American Type Culture Collection, recursos dedicados a la recopilación, conservación y distribución de la auténtica cultura de vida de microorganismos, virus, sondas de ADN, plantas y células humanas y animales.

Bacterias: Agentes infecciosos unicelulares que viven y se reproducen generalmente sobre materia orgánica muerta, y a veces son capaces de causar enfermedades en seres humanos.

Cápsula: La capa más exterior de las bacterias, situada por fuera de la pared celular.

Carbohidratos: Son aldehídos o cetonas polihidroxiados. Constituyen una de las familias de macromoléculas de origen biológico más diversas y abundantes.

Crónico: Se refiere a algo que continúa o persiste durante un período de tiempo prolongado.

DMSO: El dimetil sulfóxido, es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro. Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares el DMSO sirve como acarreador de drogas o venenos.

Efectos colaterales: Cualquier respuesta a un medicamento que sea nociva y no intencionada, y que tenga lugar a dosis que se apliquen normalmente en el ser humano para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades, o para la restauración, corrección o modificación de funciones fisiológicas.

Fármaco: Es toda sustancia química purificada utilizada en el tratamiento, cura, prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado.

Flagelos: Es un apéndice movable con forma de látigo presente en muchos organismos unicelulares y en algunas células de organismos pluricelulares. Un ejemplo es el flagelo que tienen los espermatozoides. Usualmente los flagelos son usados para el movimiento, aunque algunos organismos pueden utilizarlos para otras funciones

Flavonoides: Pigmentos de la planta con efecto diurético, propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas.

Glicocalix: Material polimérico extracelular producido por algunas bacterias u otras células, tales como las epiteliales.

Glicoconjugados: Carbohidratos covalentemente enlazados a lípidos ó proteínas.

Glicolípidos: Son esfingolípidos compuestos por una ceramida (esfingosina + ácido graso) y un glúcido de cadena corta; carecen de grupo fosfato. Los glucolípidos forman parte de la bicapa lipídica de la membrana celular; la parte glucídica de la molécula está orientada hacia el exterior de la membrana plasmática y es un componente fundamental del glicocálix, donde actúan en el reconocimiento celular y como receptores antigénicos.

Glicoproteínas: Son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas.

Inóculo: Es una suspensión de microorganismos vivos que se han adaptado para reproducirse en un medio específico.

***In Vitro*:** Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera un organismo vivo.

Lectinas: Proteínas ó glicoproteínas que unen de manera específica y reversible a mono- y oligosacaridos, no tienen actividad catalítica y en contraste con los anticuerpos no son producto de una respuesta inmune.

Patogenicidad: La capacidad de un patógeno para producir una infección y desarrollo de la enfermedad.

Patógeno: Cualquier microorganismo capaz de producir una enfermedad infecciosa. Incluye a los virus, bacterias, hongos y protozoos

Pigmentos: Es un material que cambia el color de la luz que refleja como resultado de la absorción selectiva del color.

Pilis: Son estructuras en forma de pelo, más cortas y finas que los flagelos que se encuentran en la superficie de muchas bacterias. Los pilis corresponden a evaginaciones de la membrana citoplasmática a través de los poros de la pared celular y la cápsula que asoman al exterior.

Principio activo: Aquella sustancia con actividad farmacológica extraída de un organismo vivo. Una vez purificado y/o modificado químicamente se le denomina fármaco.

Proteínas: Péptido con un número de residuos de aminoácidos superior a 100, están compuestas por Carbono, Hidrógeno, Oxígeno y Nitrógeno.

Resistencia bacteriana: Las bacterias son resistentes cuando pueden multiplicarse en presencia del antimicrobiano impidiendo la acción del mismo.

Simbiosis: Es un tipo de interacción biológica entre dos o más organismos de distintas especies, en la que todos salen beneficiados.

Tejido: Agrupación de células con una estructura determinada que realizan una función especializada, vital para el organismo.

Toxina: Son proteínas o lipopolisacáridos que causan daños concretos a un huésped.

RESUMEN

Este trabajo de tesis se enfocó en estudiar el efecto antibacteriano de plantas medicinales, comúnmente estudiadas en nuestro país. Hasta donde sabemos es el primer estudio a nivel mundial en el que se analizan diferentes fracciones que tienen las plantas y que pueden tener esta actividad antibacteriana. Por esta razón lo primero que se analizó es si las plantas utilizadas presentaban actividad hemaglutinante, que indica la presencia de lectinas. Los resultados mostraron que los extractos crudos de las plantas estudiadas contienen una variedad de lectinas diferentes para cada especie y con distintas afinidades para carbohidratos.

En el caso de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L), el extracto crudo, la fracción proteica y la lectina purificada presenta actividad antibacteriana solamente contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, presentando diferencias en la duración del efecto, ya que el extracto crudo tiene efecto por 24 horas, mientras que las fracciones proteicas solamente por 5 horas. En el resto de las bacterias estudiadas no presentaron efecto. Además se analizaron los pigmentos extraídos los cuales no presentaron efectos antibacteriano, este es el primer trabajo en el que se demuestra que las proteínas son las que realizan esta función ya que en trabajos anteriores sugieren que el efecto antibacteriano de la jamaica se puede deber a pigmentos. La Gobernadora (*Larrea tridentata*), solamente tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterobacter aerogenes*. La Ruda (*Ruta graveolens*) inhiben el crecimiento de *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* y *Listeria monocytogenes*, los pigmentos inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *Serratia marcescens*. El Neem (*Azadirachta indica*) inhibe el crecimiento de todas las bacterias tratadas excepto *Staphylococcus saprophyticus*, los pigmentos inhiben el crecimiento de todas las bacterias, excepto *Listeria monocytogenes*. En la Flor de Manita (*Chirandodendron pentadactylon*) inhibe el crecimiento de *E. coli* mientras que para las demás bacterias no se observa efecto inhibitorio. Con este trabajo comprobamos que el uso de tés provenientes de las plantas medicinales utilizadas en esta investigación presentan actividad antibacteriana.

I INTRODUCCION

1.- HISTORIA

Desde la antigüedad nuestros antepasados han utilizado las plantas como una forma de ayuda para poder calmar los dolores y malestares, y es así que aprovechando los conocimientos heredados de generaciones anteriores y de los indicios proporcionados por ciertos grupos étnicos que asignan cualidades curativas, se distinguen centenares de plantas y se saben muchas de las propiedades de cada una, naciendo con ello las plantas medicinales que hasta hoy en día se siguen empleando (Bahr, 1988; Went, 2001; Morales y col., 2007 Anderson y col., 2001).

Por lo que a través de la historia, la medicina tradicional y su práctica han permitido conocer el uso de estas plantas para el tratamiento de diversas afecciones. En la actualidad, numerosas investigaciones están encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica a partir de fuentes naturales, mientras otras están destinadas a verificar las propiedades que se les atribuyen. Muchos de estos trabajos han permitido validar el uso de especies vegetales empleadas en medicina tradicional. En particular, las actividades antibacterianas de estas plantas, son empleadas regularmente en nuestro país, ya que representan una alternativa que suple a medicamentos que no son empleados por sus altos costos o que no son accesibles a los niveles socio-económicos bajos de nuestra sociedad. Por otro lado, la ideología, usos y costumbres han generado tradicionalmente un mal uso y manejo de medicamentos que dan como resultado una resistencia bacteriana que va en aumento. Lo anterior representa una necesidad para generar una alternativa en los tratamientos para la población en general (Morales y col., 2007, Mier Ortiz y col., 2005).

Las investigaciones dirigidas al estudio de las plantas con potencial para auxiliar el tratamiento de numerosas infecciones, podrán servir como instrumento de apoyo médico-social para un mayor grupo poblacional, principalmente los grupos con mayor marginación. La propia industria farmacéutica se beneficia de los conocimientos en esa área. Aliada a estos factores, se destaca la importancia de la transmisión de la información verbal por "raiceros y conocedores de la planta", como única forma de

comunicación del conocimiento, en este caso la base científica, generalmente basada en experimentación empírica (Avellaneda y Col., 2000).

1.1 USOS EN LA MEDICINA TRADICIONAL

En los últimos años ha surgido un gran interés por las plantas medicinales que rodean nuestro entorno. La importancia en el estudio de las plantas medicinales es evaluar la eficacia de su uso como remedios caseros tradicionales haciendo una contribución a su validez científica y legislativa (Mier Ortiz y col., 2005).

Es común el empleo popular de partes vegetales de la planta para obtener variados efectos medicinales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos (Ali-Shtayed y col., 1998; Sanabria y col., 1998; De Los Ríos y col., 1999; Rangel y col., 2001). La OMS calcula que en todo el mundo, de la cuarta parte a la mitad de los productos farmacéuticos dispensados, tienen origen en plantas ya sea como extractos o como principios activos puros aislados de ellas o bien como fármacos semisintéticos. Considera además que el 80% de la población confía en las plantas medicinales tradicionales para fines terapéuticos en la atención primaria en salud (Sanabria, 2003; Alvarez y col., 2005).

Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales, se incluyen aquellas que poseen una potente actividad antimicrobiana, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que las hacen tóxicas para los microorganismos (Silva y Martins de Siquiera, 2000; Mier Ortiz y col., 2005). Por ejemplo, *Caesalpinia spinosa* "tara" y el *Eucalyptus sp.* "eucalipto" han sido usados tradicionalmente en el tratamiento de diversas afecciones respiratorias (Lock de Ugaz, 1994; Duke, 1985; Liu, 2000). Elementos vegetales como la cafeína y hierbas como el tarragón tienen propiedades contra virus, bacterias y hongos. Numerosos compuestos con actividad antimicrobiana han sido aislados de plantas, de ellos los más importantes corresponden a compuestos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, terpenoides, alcaloides, etc. (Maguna, 2006). La forma en que la mayoría de la población ingiere estas plantas medicinales es en la preparación de un té o un emplasto, puesto que además de ser económico es fácil adquirirlo (Liu, 2000).

1.2 ENFERMEDADES BACTERIANAS QUE REPRESENTAN UN PROBLEMA DE SALUD EN MÉXICO

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006), se diseñó para recabar información relacionada principalmente con el estado nutricional de los niños y adultos en México, el estado de salud de la población mexicana, la prevalencia de algunos padecimientos crónicos e infecciosos (<http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>).

La Organización Mexicana de Salud define a la Salud como el estado completo de bienestar físico, psíquico y social (<http://www.who.int/es/>). Las enfermedades causadas o no por agentes patógenos pueden alterar este estado. Los organismos que pueden jugar el papel de agentes patógenos para el hombre son: bacterias, virus, hongos, protozoos, helmintos y artrópodos (Romero, 2007; Brooks, 2005).

La salud de una población es un fenómeno complejo y dinámico relacionado con las condiciones materiales de vida, con la dinámica demográfica de la población, así como las costumbres de cada entidad (<http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>).

De acuerdo con diversos estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia las enfermedades diarreicas, en niños menores de cinco años de edad, han ocupado el primer lugar como causa de muerte en los países en vías de desarrollo (<http://www.who.int/es/>). Como se puede apreciar en la Figura 1 los niños de 1 año de vida presentan la mayor prevalencia.

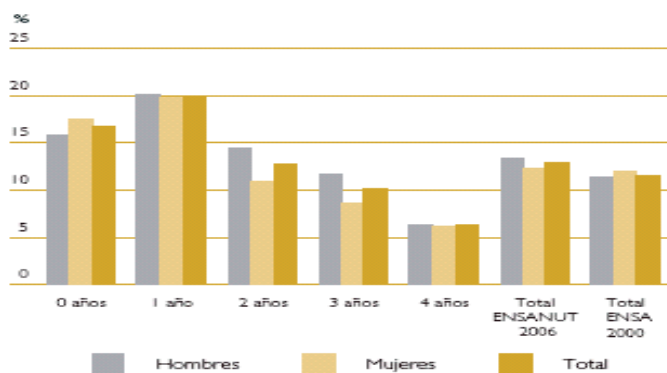


Figura 1. Índice de enfermedades diarreicas. Distribución de la población de 0 a 4 años que presentan enfermedades diarreicas, por edad y sexo en México (ENSANUT 2006).

A pesar de los avances en la medicina, las enfermedades infecciosas siguen siendo un reto para los sistemas de salud. Las enfermedades del rezago epidemiológico: diarreas, infecciones respiratorias y desnutrición, siguen provocando 15% de los fallecimientos en menores de un año de edad. En la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA 2000) la prevalencia de diarrea (eventos en las dos semanas previas) en niños menores de cinco años fue de 11.5 % y en la ENSANUT 2006 es de 12.9 %. A pesar de los esfuerzos realizados por las autoridades sanitarias del país, no se ha logrado disminuir la frecuencia de este padecimiento, que continuará siendo uno de los grandes retos para el sistema de salud (<http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>).

La ENSANUT 2006 señala que en el interior del país la frecuencia de diarrea en menores de 5 años continúa presentando diferenciales importantes. Por ejemplo, mientras en Zacatecas la prevalencia es de 5.9 %, en Chiapas es de 21.1 %. Las entidades que presentaron una prevalencia por arriba de la media nacional son: Chiapas, Distrito Federal, Puebla, Tabasco, Colima, Jalisco, México, Baja California, Guerrero, Quintana Roo y Baja California Sur.

Por otro lado las infecciones respiratorias agudas (IRA), junto con otras enfermedades de la infancia, como las diarreicas y las deficiencias de la nutrición, son en México la principal causa de demanda de atención médica en los menores de cinco años. En la ENSANUT 2006 se encontró que la prevalencia general de IRA en los niños con

menos de 10 años fue de 42.7 %. Aproximadamente uno de cada dos niños de un año o menos las presenta, y su frecuencia desciende conforme aumenta la edad. Sin embargo, aun a los nueve años, una tercera parte de los niños se ve afectado por estas enfermedades (<http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>).

El uso de los llamados medicamentos antidiarreicos, frecuentemente se asocia con efectos colaterales indeseables que pueden ocasionar hasta la muerte. El abuso de antibióticos es causa de diarreas prolongadas lo que conlleva a la aparición de desnutrición infantil (<http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>).

La actual predisposición a consumir productos naturales y, en muchas regiones (principalmente las regiones indígenas y campesinas), la difícil disponibilidad y accesibilidad a los medicamentos han llevado a las poblaciones del mundo desde tiempos remotos a buscar otras alternativas para aliviar sus dolencias, por lo que en nuestro país se ha recurrido al uso de las plantas medicinales, estas plantas tienen proteínas, que junto con otros compuestos como son pigmentos y ácidos poseen los principios activos. Dentro de las proteínas se encuentran lectinas, donde están ampliamente documentada las actividades antibacterianas es por ello que a continuación se describen brevemente a estas proteínas.

2.- LECTINAS

Las lectinas fueron descubiertas en los primeros años del siglo XX, pero no fue hasta los años 60 cuando empezaron a ser estudiadas con atención (Balderas, 2005). La palabra Lectina proviene del latín *légere*, que significa seleccionar ó escoger (Stryer, y *col.*, 2003, Sharon y Lis, 2004).

2.1 DEFINICION

Las lectinas son un grupo diverso de proteínas o glicoproteínas que reconocen y se unen de manera reversible y específica a mono y oligosacáridos que se encuentran en la superficie de las células, en su interior o de forma libre, carecen de actividad catalítica y de origen inmunológico (Stryer, y *col.*, 2003; Sharon y Lis, 2004; Bohinski, 1991).

2.2 DESCRIPCION

Estas proteínas contienen uno o más sitios de reconocimiento de carbohidratos por moléculas (son divalentes o polivalentes), que pueden estar constituidos principalmente por: D- Manosa, D-galactosa, D-Glucosa, L-Fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico o N- acetil-neuramínico, glucosamina y galactosamina (Sharon y Lis, 2001; Bohinski, 1991). Las lectinas varían en tamaño, estructura y organización molecular, se unen a los carbohidratos de forma no covalente.

2.3 METODO DE DETECCION Y CARACTERIZACION

Este método se basa en su capacidad para aglutinar y precipitar eritrocitos, la hemaglutinación que puede ser inhibida por la adición de azúcares específicos de esa lectina. Generalmente las lectinas no reconocen al oligosacárido completo del glicoconjugado, sino más bien a monosacáridos (Balderas, 2005).

2.4 FUNCION

Las lectinas se encuentran presentes tanto en el reino animal, vegetal y en microorganismos (bacterias, protozoarios) y en virus (Stryer y *col.*, 2003; Balderas, 2005; Barondes, 1988; Sharon y Lis, 2001; Hart, 1980; Bohinski, 1991; Sharon y Lis, 1993, 2001, 2004), La función que realizan las lectinas va a depender del microorganismo en el que estén presentes, en la tabla 1 se muestran ejemplos de las diferentes funciones.

Tabla 1. Funciones de lectinas en diferentes organismos (Córdoba, 2000; Hansen; 1993).

ORGANISMO	FUNCION
Microorganismos (bacterias, virus, hongos, parásitos, etc.)	• Determinar la patogenicidad de bacterias y de parásitos. • Reconocimiento de determinantes no inmunes en la fagocitosis. • Reconocimiento de determinantes de la adhesión celular.
Plantas	• Unión de bacterias fijadoras de Nitrógeno en leguminosas • Protección contra fitopatógenos
Animales	• Regulación de migración y adhesión celular. • Endocitosis y translocación intracelular de glicoproteínas. • Reconocimiento de la adhesión no inmune en la fagocitosis. • Unión de las bacterias a células epiteliales.

2.5 CLASIFICACION

Existen diferentes clasificaciones de las lectinas. A continuación se describe una clasificación basada en el origen, naturaleza y características (Stryer, y col., 2003).

2.5.1 LECTINAS EN PLANTAS

Las plantas siguen siendo la fuente más rica de lectinas y las más caracterizadas. Muchas de ellas son de las semillas de las plantas aunque también se han obtenido de

otros tipos de tejidos vegetativos como la corteza, hojas, tallos, frutos y raíces. Aunque aislados de la misma familia y tejidos que son estructuras similares estos pueden tener diferentes características específicas por el monosacárido (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

Unas de las funciones importantes de las lectinas presentes en las plantas es que participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de plantas de leguminosas; poseen actividad mitogénica, tienen efectos protectores en contra de la acción patogénica de ciertos microorganismos así como de simbiosis de la planta con bacterias benéficas (Hernández, 2005; Pérez y col., 2005). Por otro lado también tienen el potencial de proporcionar los medios para investigar el posible papel de la célula bacteriana asociada a lectinas en el cumplimiento de estas bacterias procariotas en los tejidos (Hart, 1980).

Dentro de las lectinas de las plantas se encuentran las legumbres que son las más estudiadas, y los cereales.

- LEGUMBRES

Las lectinas de semillas de leguminosas comprende la familia mas grande de proteínas, todos ellos constan de 2 o 4 subunidades idénticas con un solo carbohidrato en su sitio de unión y Ca y Mn que son necesarios para la vinculación del carbohidrato (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001, 2004)

- CEREALES

Las lectinas de esta familia son específicas para todos los N-acetilglucosamina y N-acetilneuraminidasa (Ac. Siálico) y consisten en 2 subunidades idénticas. Las lectinas de los cereales son ricas en cisteína y carecen de metales, esto es lo que las diferencia de las leguminosas (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

Hay 4 lugares por cada dímero para la combinación de la lectina, cada uno situado en el punto de intersección de las subunidades y formadas por aminoácidos que incluyen: varias tirosinas, 2 serinas y 1 ácido glutámico (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

2.5.2 LECTINAS EN ANIMALES

Estas lectinas se han encontrado tanto en invertebrados como: caracoles, cangrejos, camarones, moluscos, peces y lombrices, como en vertebrados como el cerdo principalmente, que están contenidas en la hemolinfa y órganos sexuales (Bohinski, 1991).

Las lectinas animales desempeñan una gran variedad de funciones en estos organismos, intervienen, entre otras, en funciones de defensa frente a patógenos, tráfico celular, regulación inmune o adhesión celular. La enorme cantidad de lectinas animales descubierta en los últimos años puede ser clasificada en base a su estructura y propiedades en varias familias: Galectinas (tipo S), Tipo C, Tipo I, Tipo P y Pentraxinas (Balderas, 2005).

GALECTINAS

Las galectinas son específicas para β -galactósidos como la lactosa y N- acetil-lactosamina, se encuentran tanto en el interior del citoplasma como en el interior del núcleo de las células y ocasionalmente también en la superficie celular y fuera de la célula, acopladas a proteínas o en forma libre (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

Las galectinas se unen a monómeros así como a grandes polipéptidos cada una de las cuáles contiene 1 ó 2 dominios de reconocimiento para hidratos de carbono conocidos como S-CRD. Las galectinas no requieren de iones metálicos. La unión de los hidratos de carbono a galectinas son vinculados entre los C4 hidroxilo y 3 cadenas de aminoácidos que son histidina, arginina y asparagina (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

LECTINAS TIPO C

Son dependientes de Ca, su reconocimiento de dominio designado como C- CRD, todas las C – lectinas están compuestas por moléculas de multidominio en la que el CRD se adjunta a un número variable de dominios polipéptidos de diferentes tipos. Los tipos C-lectinas se agrupan en 3 familias: selectinas, colectinas y lectinas endocíticas (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

SELECTINAS

Estas constan de 3 miembros E- selectina, P- selectina y L- selectina. Todas las selectinas reconocen el ácido siálico que contengan los tetrasacáridos de S- Le^x y en menor medida su isómero S- Le^a (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

COLECTINAS

Son un grupo de 5 proteínas solubles, se encuentran en el suero de mamíferos y aves. Un importante miembro de este grupo es la manosa PAM –A que es un trímero basado en una triple hélice formada en parte por colagenasa.

MBP –A circula en el suero de roedores y en el hombre como trímero de hexámeros. El MBP –A se une a manosa a través de Ca que sirve como núcleo en el sitio de combinación e interactúa en el 3 –OH Y 4 –OH de el ligando (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

LECTINAS ENDOCITICAS

Un destacado representante de las lectinas endocíticas es el complejo hepático que tiene un receptor RHL (conejo hepático asialoglicoproteínas). Se encuentra en hepatocitos de diferentes mamíferos y es específico para la galactosa y N-acetilgalactosamina (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

LECTINAS TIPO P

Son proteínas transmembranales, que unen a Manosa 6 fosfato. Contiene dos tipos de receptores: el CD-MPR y el IGF-II/CI-MPR. La presencia de Man-6-P en enzimas solubles sirven como señal para la translocación hacia lisosomas en el trans-Golgi (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

LECTINAS TIPO PENTRAXINAS

En base a un análisis de comparación de homologías se ha propuesto que su origen se dio por duplicación genética en la evolución temprana de mamíferos. Participan en la inmunidad innata de la respuesta temprana del hospedero contra patógenos

externos. Su estructura contiene 5 sitios de unión a carbohidratos, cada uno localizado entre dos hojas betas adyacentes. (Sharon y Lis, 1989, 1993, 2001).

2.5.3 LECTINAS MICROBIANAS

Los microorganismos también tienen lectinas (llamadas adhesinas), estas se localizan en la superficie de las células, en unas pequeñas vellosidades llamadas pilis (pelos) y en flagelos que les proporcionan movimientos y les permite reconocer los azúcares simples o conjugados en las superficies celulares y así poder reconocer e invadir a un tejido en particular y diferenciarlo de otros. Algunas bacterias poseen glicoconjugados que se unen a lectinas de la célula huésped, otras bacterias poseen lectinas denominadas adhesinas que se unen a glicoconjugados de la célula huésped (Balderas, 2005; Davis. 1993; Jaramillo, 2002). A continuación se presenta unas tablas que indican la especificidad hacia carbohidratos por lectinas bacterianas.

Tabla 2. Especificidad de bacterias por carbohidratos. Diferentes lectinas bacterianas que reconocen específicamente un tipo de monosacárido (Hart, 1980; Sharon y Lis, 2001).

LECTINAS BACTERIANAS	CARBOHIDRATO
<i>Vibrio cholerae</i>	L-fucosa, D-manosa
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	D-galactosa, N-acetyl-D-galactosa
<i>Escherichia coli</i>	D-manosa, D-galactosa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D-galactosa, D-manosa
<i>Aeromonas hydrophila</i>	L-fucosa o D-galactosa o D-manosa
<i>Enterobacter sp.</i>	D-manosa

Tabla 3. Agrupación de diferentes bacterias que reconocen al mismo tipo de carbohidrato (Jaramillo, 2002; Pérez, 1999).

Sialoglicoconjugados	Glicosaminoglicanos	Ácido siálico
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli enterotoxigénico</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Listeria monocitogenes</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Streptococcus suis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Micoplasma pneumoniae</i>
<i>Micoplasma pneumoniae</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	

Tabla 4. Ejemplos de Interacción de adhesinas bacterianas con glicanos. ? = no determinado (Varki y col., 1999).

Bacteria	Tejido diana	adhesina	Especificidad
<i>Escherichia coli</i>	Urinario	P-fimbria	Gal α 4Gal β -
<i>Escherichia coli</i>	Intestino	S-fimbria	Neu5Ac α 3Gal β 4Glc β Cer
			GalNAc β 4(Neu5Ac α 3)Gal β 4Glc β Cer
<i>Escherichia coli</i>		Tipo- 1 fimbria	Manosa, glicoproteinas
<i>Propionobacterium</i>	Intestino, piel	?	Gal β 4Glc β -Cer
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Respiratorio	?	GlcNAc β 3Gal-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Urinario	?	Gal β 4GlcNAc-
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Boca	?	Gal β 3GalNAc β -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Respiratorio	?	GalNAc β 4Gal
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Genital	?	Gal β 4Glc β -Cer, NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc-
<i>Helicobacter pylori</i>	Estomago	?	

Las lectinas bacterianas pueden contener dos tipos de subunidades: toxinas y lectinas que se emplean para la unión de bacterias a la célula huésped. Las toxinas bacterianas son proteínas de gran simetría, que contienen 5 subunidades capaces de ligar carbohidratos y una unidad que es la que actúa como toxina. Las lectinas son empleadas por la bacteria para fijarse a la célula que será colonizada e impide su arrastre por fluidos extracelulares (Balderas, 2005).

Toxinas bacterianas

Las toxinas bacterianas, como la enterotoxina del cólera, enterotoxina de *Escherichia coli*, la toxina del tétanos, las toxinas de *Shigella*, todas estas toxinas tienen la capacidad de unir a los hidratos de carbono complejo a la célula del huésped.

Por ejemplo el receptor de la toxina de *Shigella* parece ser una glicoproteína de membrana que contiene residuos de β -1,4-N-acetilglucosamina. La actividad de la toxina en el cultivo de tejidos de células puede ser inhibida mediante la adición de inhibidores de carbohidratos específicos por ejemplo polímeros de N-acetilglucosamina (Hart, 1980).

Tabla 5. Ejemplos de receptores de glicosfingolípidos para toxinas bacterianas (Varki y col., 1999) .

<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina cólera	Intestino delgado	Gal β 3GalNAc β 4(NeuAc α 3)Gal β Cer (GM1)
<i>Escherichia coli</i>	Toxina termolábil	Intestino	Gal β 3GalNAc β 4(NeuAc α 3)Gal NeuAc α 8)Cer (GM1)
<i>Clostridium tetani</i>	Toxina tetánica	Membrana del nervio	G1b gangliósidos
<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina botulinica Toxina (A-E)	Membrana del nervio	(NeuAc α 8)NeuAc α 3Gal β 3GalNAc β 4(NeuAc α 8) (NeuAc α 3) Gal β 4Glc β Cer
<i>Clostridium difficile</i>	Toxina a	Intestino grueso	GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β Cer
<i>Shigella dysenteriae</i>	Toxina shiga	Intestino grueso	Gal α 4Gal β Cer Gal α 4Gal β Glc β Cer GlcNAc β 4GlcNAc

2.6 ADHESINAS MICROBIANAS Y RECEPTORES GLICOCONJUGADOS EN LA SUPERFICIE CELULAR

Estas adhesinas interactúan con glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos. La interacción adhesina-receptor puede resultar en señal de la transducción de eventos críticos por colonización e infección, como se puede apreciar en la Figura 2.

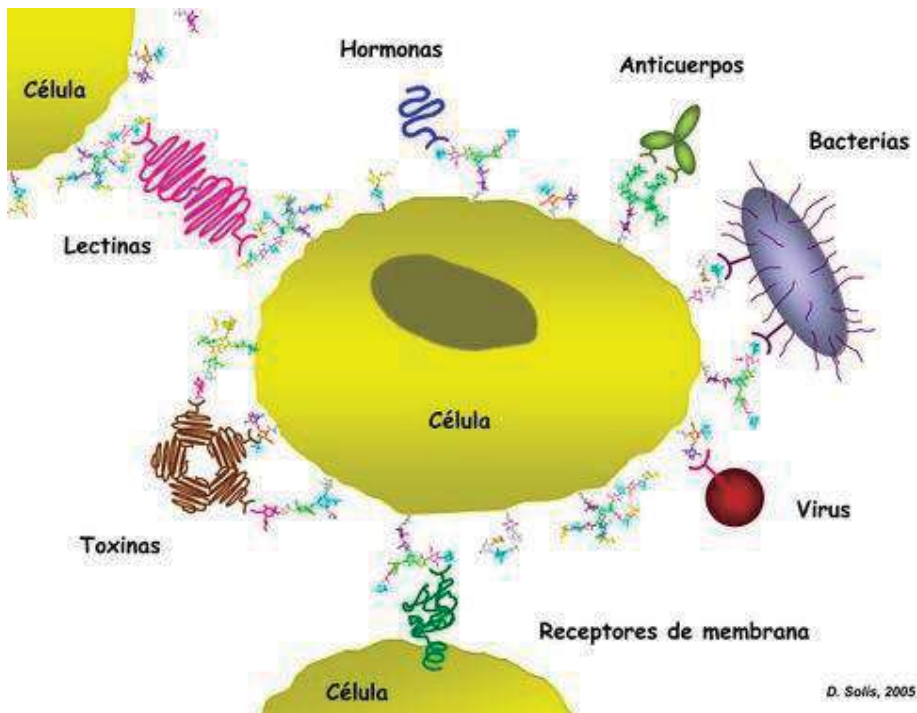


Figura 2. Interacción lectina-carbohidrato. Diferentes interacciones lectina-carbohidrato para que se lleve a cabo la infección (www.iqfr.csic.es).

2.7 ADHESINAS UNIDAS A GLICOLIPIDOS

La especificidad de unión se puede explicar con el tropismo del tejido en el organismo, por ejemplo el epitelio del intestino grueso expresa Gal β 4Glc- Cer, mientras que las células del intestino delgado no lo expresan y esto explica el por que existen bacterias que pueden colonizar al intestino grueso en condiciones normales como son, por ejemplo, *Clostridium*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus*. Varias cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas reconocen Gal α 4Gal que se encuentra en los glicolípidos localizados en estructuras internas o terminales del epitelio de la vejiga lo que concuerda con los reportes de infecciones del tracto urinario y el fenotipo de grupo sanguíneo conteniendo el antígeno P1(receptor para el parvovirus-B19, asociados a determinantes sanguíneos ABO) por lo que la presencia o ausencia de este antígeno es un factor que influye en la adherencia de bacterias a las células uroepiteliales (Varki y col., 1999).

Otro ejemplo es la toxina proveniente de *Vibrio cholerae* que consiste en dos subunidades y se une a un receptor de gangliósido localizados en estas subunidades, la subunidad B reconoce a los glicolípidos de la membrana y posteriormente la subunidad A entra en la célula provocando daño este mismo mecanismo a sido descrito para toxinas provenientes de *Shigella disentería*, *Bordetella pertusis* y *Escherichia coli* (Varki y col., 1999).

2.8 MECANISMO DE ACCION (INFECCION)

El primer paso de una infección, es el reconocimiento de las bacterias (adhesinas) hacia los carbohidratos presentes en un tejido particular, una vez que se ha identificado, la bacteria se une a este tejido y comienza a invadirlo y a destruirlo y posteriormente puede invadir otros tejidos, generando una infección en todo el organismo. En las bacterias se encuentran múltiples adhesinas que reconocen a diferentes azúcares lo que explica porque un tipo en particular de bacteria solamente ataca un tejido. Muchas infecciones se realizan porque las bacterias reconocen a los carbohidratos de células epiteliales del tracto gastrointestinal (Davis. 1993; Jaramillo, 2002).

Para que la infección pueda ocurrir tiene que pasar el glicocalix y rodear a la célula, unido a la superficie de la célula este coloniza el tejido (Cabello, 2005), las lectinas son

muy abundantes en plantas y estas pueden reconocer a las bacterias identificando carbohidratos terminales o intermedios en las Gramnegativas principalmente van a identificar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y glicoproteínas y en las Grampositivas que carecen de membrana interna identifican a polisacáridos, ácido lipoteico, ácido teicoico y peptidoglicanos (Davis. 1993; Jaramillo, 2002).

3.- BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS

Existen dos grandes grupos de especies bacterianas (Cabello, 2005), las bacterias Grampositivas y las Gramnegativas, llamadas así según su respuesta a la técnica de tinción Gram, denominado así por el histólogo Hans Christian Gram, en donde se decolora una bacteria Gramnegativa y no una Grampositiva. La diferencia entre ambas bacterias reside en la pared celular (Books, 2005).

La envoltura celular de las células Grampositivas está constituida por 2 a 3 capas: la membrana citoplásmica, una capa de peptidoglicano gruesa, algunas bacterias poseen una capa externa, ya sea una cápsula o una capa S (Books, 2005; Cabello, 2005).

La envoltura celular de las células Gramnegativas es una estructura muy compleja de múltiples capas. La membrana citoplásmica está rodeada por una capa laminar sencilla de péptidoglicano a la cuál está anclada una capa compleja denominada membrana externa. También puede estar presente una cápsula como envoltura más externa o una capa S (Cabello, 2005; Books, 2005).

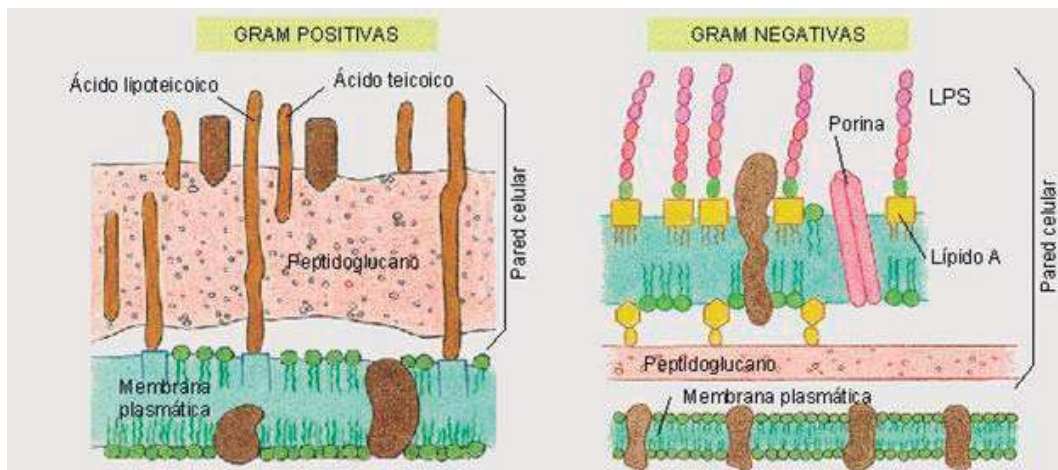


Figura 3. Envoltura celular Grampositiva y Gramnegativa. Diferenciación de la envoltura celular de de las bacterias Gramnegativas y Grampositivas.

Las capas de la envoltura celular ubicadas entre la membrana citoplásmica y la cápsula se conocen colectivamente como pared celular. En las bacterias Grampositivas está constituida principalmente por peptidoglicano y ácido teicoico, en las Gramnegativas la pared celular incluye al peptidoglicano y a la membrana externa. La pared celular bacteriana debe su resistencia a una envoltura compuesta por una sustancia denominada peptidoglicano (Cabello, 2005; Books, 2005).

La capa de peptidoglicano es un polímero complejo que consta de 3 partes: una columna vertebral compuesta de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico alternados; un grupo de cadenas tetrapeptídicas laterales idénticas adheridas al ácido N-acetilmurámico y un conjunto de puentes peptídicos transversales también idénticos. La columna vertebral es la misma en todas las especies bacterianas; las cadenas tetrapeptídicas laterales y los puentes peptídicos transversales varían de especie a especie. Las cadenas tetrapeptídicas laterales de todas las especies tiene ciertas características en común; casi todas tienen L-alanina en la posición 1 (adherido al ácido N-acetilmurámico); D-glutamato o algún sustituto en la posición 2 y D-alanina en la posición 4, la posición 3 es la más variable. La mayor parte de las bacterias Gramnegativas tienen ácido diaminopimélico en esta posición, al cuál se liga la lipoproteína de al pared celular. Las bacterias Grampositivas pueden tener ácido

diaminopimérico, L-lisina o cualquiera de otros L-aminoácidos en la posición 3 (Books, 2005).

4.- PLANTAS MEDICINALES

4.1 JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*)

Existen más de 150 especies del género *Hibiscus*, la especie más empleada con finalidades terapéuticas es el *Hibiscus* de Centroamérica (*Hibiscus sabdariffa* L), (<http://www.uv.mx/Omobuwajo>, et al., 2000).

Es conocida con los siguientes nombres comunes: Karkade, Roselle (inglés), Sorrel (inglés del Caribe), Guinea sorrel, Rosa de jamaica, Flor de jamaica, Agrio de Guinea, Quetmia ácida, Viña, Bissau (francés de Senegal), Roselle carcadé (francés), Omítete (inglés de Namibia), Baril (Panamá), (Badreldin y col., 2005; Readers Digest, 2007; <http://es.wikipedia.org>, <http://www.uv.mx>).

Dentro de la clasificación científica de la Planta de Jamaica se encuentra: Reino: Plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Malvales, Familia: Malvaceae, Género: *Hibiscus*, Especie: *sabdariffa*, Denominación binaria: *Hibiscus sabdariffa* L. (http://es.wikipedia.org/wiki/Hibiscus_sabdariffa).

A esta planta se le ha referido como un arbusto, el cuál mide alrededor de 2.5 m de altura, su tallo tiene una coloración roja, cilíndrica, lisa y suave, sus hojas son verdes, crecen de manera alterna y miden de 7.5 a 12.5 cm de longitud. Las hojas de la parte baja pueden contener de tres a siete lóbulos con orillas dentadas. Las flores aparecen individualmente en las uniones de las hojas y miden 12.5 cm de ancho; son de color amarillo con el centro de color rosa a marrón. El cáliz, el tallo y las hojas tienen sabor ácido, muy parecido al arandino agrio de los pantanos. La cápsula es verde cuando está inmadura y tiene cinco válvulas (<http://www.uv.mx>).

Se utilizan las flores de la jamaica para la preparación de extractos que provienen de la cocción de las mismas, con lo que se elaboran jarabes y licores, así como también mermeladas, saborizantes y gelatinas. La fibra que se puede extraer, se emplea en la elaboración de canastas y bebidas refrescantes. La semilla que se ha obtenido de la

jamaica es una fuente excelente de aceite de cocina (<http://www.uv.mx>). El uso de tallos y hojas es principalmente en la preparación de sopas y salsas, los cálices se ocupan como sustitutos de café (Omobuwajo, 2000).

En sus propiedades nutricionales esta reportado que el aceite y la semilla son una fuente importante de contenido proteico y calórico (33 % proteína, 24 % carbohidratos y 22 % de grasa) y sustanciales cantidades de fibra (14 % de peso seco como fibra) y considerables micronutrientes. Las flores contienen altos niveles de minerales, tales como hierro (88 mg/100 g), magnesio (442 mg/100 g), calcio (1.28 %) y selenio (0.09 mg/kg) y vitamina C, (Omobuwajo, 2000, <http://www.uv.mx>).

Los componentes químicos reportados son los siguientes: Ácidos orgánicos (ácidos frutales): ácido hísico, ácido protocateico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido cítrico, ácido hibiscus y ácido tartárico (Badreldin y col., 2005). También contienen mucilagos, de efecto antitusígeno (para tratar la tos) y aceites vegetales llamados fitoesteroles.

Contiene diferentes pigmentos como antocianinas, hibiscina, gosipitina, quercetina, mirecetina, hibiscetina, hibiscetrina y sabedaretina, siendo los principales las antocianinas que le dan la coloración brillante roja (cianidina) y azul (delfinidina), (Prenesti y col., 2005, <http://www.uv.mx>).

Los compuestos fenólicos son los que le dan el sabor ácido, esta acidez le proporciona frescura y es bactericida. Se ha reportado la presencia de β - caroteno, riboflavina, tiamina, niacina y ácidos ascórbico, málico e hibisco (Salama, 1979; El-Merzabani, 1979; Alarcón y col., 2007).

En la medicina tradicional se reconoce que la jamaica tiene efectos terapéuticos benéficos para la salud y mínimos efectos colaterales. Por lo que se utilizan los extractos de la flor para tratar diversas afecciones incluyendo hipertensión, enfermedades hepáticas, fiebre, enfermedades nerviosas y calcificaciones de las arterias. Además tiene acciones antiparasitarias, diuréticas y laxantes, por lo que ayuda en el proceso digestivo, circulatorio y renal. Así como también presenta efectos antibacterianos y antifúngicos (Santana y col., 2007; Badreldin y col., 2005; Ajay y col., 2007; Alarcón y col., 2007).

4.2 GOBERNADORA (*Larrea tridentata*)

La gobernadora es una de las especies más importantes en la vegetación natural de los desiertos mexicanos. En México se le conoce con los siguientes nombres comunes: Creosote, gobernadora, hediondilla, guamis, huamis (Correll y Johnston, 1970; Martínez, 1979; <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>).

La clasificación científica de la Planta de la Gobernadora se encuentra: Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares); Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas); División: Magnoliophyta (plantas con flor); Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas); Subclase: Rosidae; Orden: Sapindales; Género: *Larrea*; Especie: *tridentata* (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>).

Esta planta es originaria de Estados Unidos y México, es una especie dominante en la vegetación de desiertos y zonas áridas, en México se encuentra en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas y Zacatecas (Correll y Johnston, 1970; Villaseñor y Espinosa, 1998).

La Gobernadora es un arbusto aromático con olor a creosote (especialmente cuando esta húmedo), tiene un tamaño de hasta 4 m de alto, con hojas de color verde oscuro a verde amarillento opuestas, compuestas de 2 hojitas puntiagudas y unidas hacia la base; presenta flores amarillas brillantes de 2.5cm de diámetro; el fruto tiene forma de cápsula, globosa, cubierta de abundantes pelos largos blancos o rojizos. El tallo se observa muy ramificado desde cerca de la base, corteza gris (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>).

Dentro de sus usos y aplicaciones principales encontramos que es muy utilizada en la medicina e industria. Durante mucho tiempo los habitantes del desierto mexicano han utilizado a la Gobernadora como planta medicinal, uso por el cual es mayormente

conocida. Las hojas, en pequeñas cantidades, son empleadas en té, principalmente para cálculos renales y malestares como dolor de riñón o inflamación de vejiga. En problemas ginecológicos como esterilidad femenina se sugieren lavados vaginales con el cocimiento de las hojas; también se emplea la raíz, ramas o corteza para el postparto y para regularizar la menstruación. Dentro de la industria se utiliza para la elaboración de cremas, jabones, champú anticaspa y hasta pomada contra herpes labiales. Se utiliza como colorante y forraje, aunque muchos animales no lo comen. Además es útil para recuperar superficies degradadas en zonas áridas. También se cultiva ocasionalmente como ornamental (http://www.mexicoforestal.gob.mx/nuestros_arboles.php?id=76).

Es importante resaltar que si no se consume en las dosis recomendadas esta planta provoca daño hepático. Por su alto grado tóxico, la Gobernadora también se usa para destapar radiadores de autos y limpiar calderas. Por este mismo motivo su consumo para fines medicinales es riesgoso cuando es en grandes cantidades (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>;
http://www.mexicoforestal.gob.mx/nuestros_arboles.php?id=76)

4.3 RUDA (*Ruta graveolens*)

La clasificación científica de la Planta de la Ruda se describe a continuación Nombre científico: *Ruta graveolens* L., Reino: Plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Sapindales, Familia: Rutaceae, Subfamilia: Rutoideae, Género: *Ruta*, Especie: *graveolens* (http://es.wikipedia.org/wiki/Ruta_graveolens;
<http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>).

Es conocida con los siguientes nombres: Ruda, Bortusai, Erruda, Moskatxa, Arruda, Ruta. Es una planta arbustiva aromática de hasta 150 cm de altura, tallos erectos, ramificados; sus hojas alternas son carnosas de un color verde amarillentas muy divididas y provistas de glándulas que le proporcionan su particular olor fuerte, sofocante y no muy agradable; sus flores de hasta 2 cm con pétalos ligeramente dentados y sus frutos se encuentran en forma de cápsula con cinco lóbulos (<http://www.zonaverde.net/rutagraveolens.htm>;
<http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>).

Esta planta habita principalmente en tierras secas mediterráneas, junto a paredes, a veces cultivada como planta de jardinería puede encontrarse en viviendas, originaria de Europa meridional y actualmente extendida por las zonas templadas y cálidas del hemisferio Norte (<http://www.zonaverde.net/rutagraveolens.htm>; <http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>).

Sus principios activos son: aceite esencial rico en ácidos (anísico, caprílico y salicílico); terpenos (limoneno, pineno y cíñelo); 2-undecanona, metilnonilcetona, metilnonil-carbinol; alcaloides (arborinina, graveolina, graveolinina, skiaminina, dictamnina, citisina o soforina, cocusaginina etc.); taninos; cumarinas especialmente furocumarinas como el bergapteno; rutina; principios amargos y vitamina C. Dentro de sus partes activas se encuentra principalmente el aceite esencial, aunque en menor cantidad toda la planta (<http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>).

En la medicina tradicional se utiliza para en el tratamiento de ciertas enfermedades del sistema circulatorio como várices y hemorroides ya que tonifica las arterias y protege los capilares, es uno de los emenagogo más potentes (sustancia que por sus efectos congestivos se emplea para provocar o aumentar la menstruación), también presenta propiedades rubefacientes (produce un enrojecimiento externo de la piel), se emplea para reducir el dolor y la inflamación en las enfermedades reumáticas; en la amenorrea, en parasitosis, excelente para calmar la otitis (dolor de oídos), para tratar el vitíligo, por otro lado esta planta presenta un efecto depresor sobre el sistema nervioso central, actúa sobre el aparato digestivo produciendo irritaciones en la mucosa intestinal, mucosas bucofaringeas (http://es.wikipedia.org/wiki/Ruta_graveolens; <http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>).

En la industria alimentaria esta planta entra a formar parte en las preparaciones donde se utiliza para dar sabor a los alimentos, es ingrediente vital en muchos licores (<http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>).

4.4 NEEM (*Azadirachta indica*)

Es conocida con los siguiente nombres: margosa o lila india es un árbol originario de la India y Birmania, miembro de la familia de la caoba (Shultz y col, 1992).

Tiene la siguiente **clasificación científica**: Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Orden: *Sapindales*, Familia: *Meliaceae*, Género: *Azadirachta*, Especie: *indica*, Nombre binomial: *Azadirachta indica* (http://es.wikipedia.org/wiki/Azadirachta_indica).

El neem es un **árbol** de rápido crecimiento que puede alcanzar 15 a 20 metros de altura, las **flores** son blancas dispuestas axialmente y mide de 5 a 6 mm de longitud y de 8-11 de ancho (http://es.wikipedia.org/wiki/Azadirachta_indica).

Dentro de sus usos reportados encontramos que se emplea como antiséptico general, así como también para el tto. de una gran variedad de enfermedades de la piel, por ejemplo, llagas sépticas, quemaduras infectadas etc. También presenta actividad fungicida demostrando su eficacia contra determinados hongos que infectan a humanos como *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum Trichosporon*, *Geotrichum* y *Candida*. De la misma forma también presenta propiedades antibacterianas, actividad antiviral, insecticida, antihelmíntico, en tratamientos dentales, enfermedad del Chagas, antipalúdico, antimalárico, analgésico, antipirético, anti-inflamatorios. (Shultz y col, 1992; Conrick, 2003).

De las hojas se pueden aislar varias moléculas como: un flavonoide polifenólico llamado quercetina, un sitosterol, el nimboesterol, nimbina y otros liminoides, como la nimocinolida e isonimocinolida (<http://www.neem.es/>).

4.5 FLOR DE MANITA (*Chiranthodendron pentadactylon*)

El árbol de flor de manita es originario de México, este árbol es frondoso y mide de 10 a 15 m de altura, sus hojas son anchas, la flor es de color rojo con sus estambres aterciopelados, muy parecida a una mano extendida y sus frutos son cápsulas leñosas, pentalobuladas de aproximadamente 12 cm de largo, estos contienen pequeñas semillas ovoides de color negruzco. Durante mucho tiempo se ha venido utilizando en forma de té en la medicina tradicional debido a que tiene una variedad de usos tradicionales mencionando algunos tenemos que sirve para controlar afecciones del corazón, de igual forma como tranquilizante del sistema nervioso, además también para el tratamiento de úlceras crónicas, inflamación de los ojos, como antioxidante, antitrombótico, anticancerígeno, antibacteriano, antifúngico entre otros (Broca y col, 1997). Dentro de al

actividad antibacteriana se demostró que esta planta tiene actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* y *Salmonella sp.* Con lo que se ratifica la utilidad en el tratamiento de problemas gastrointestinales.

En el análisis de los compuestos realizados en los extractos acuosos y metanólicos de estas plantas se demostró que contienen fenoles y flavonoides.

5.- REPORTES DE USOS CON ACCIONES ANTIBACTERIANAS

Existen numerosos reportes en los que se confirma esta actividad a continuación se resumen los relacionados con plantas medicinales utilizadas en este trabajo.

Se utilizaron 26 especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de desordenes gastrointestinales, prepararon extractos acuosos y metanólicos y los probaron contra *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella sp.* La Flor de Manita *Chiranthodendron pentadactylon*, así como otras 5 especies mas presentan actividad antibacteriana contra enteropatógenos y ofrecen un método alternativo en el tratamiento de estas infecciones gastrointestinales, por otro lado cabe mencionar que los extractos metanólicos presentan mayor actividad antibacteriana que los extractos acuosos (Alanís y col., 2005).

En otro estudio se realizo un trabajo en donde se evaluó la actividad antibacteriana de cuatro extractos alcohólicos: de gobernadora (*Larrea tridentata*), de ruda (*Ruta graveolens*), de tomillo (*Thymus vulgaris*) y de perejil (*Petroselinum sativums*); contra cepas hospitalarias con resistencia múltiple de *S aureus*. Los extractos alcohólicos se prepararon con la planta fresca completa (ruda, perejil, gobernadora y tomillo), por maceración y dilución con alcohol de caña (70°). Las pruebas de susceptibilidad bacteriana a los extractos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la NCCLS, en donde se observo que todos los extractos vegetales probados tienen efectos antibacterianos en cepas hospitalarias de *S. aureus* con resistencia múltiple. También se detectó la presencia de omega 3 y 6 en el extracto alcohólico de la ruda y omega 3 en el extracto alcohólico de perejil. El ácido palmítico fue el componente con mayor presencia en los extractos (ruda, tomillo, gobernadora y perejil). Concluyen que los componentes fenólicos son los responsables de la actividad bactericida como por ejemplo timol, carvacrol y eugenol (Lujám y col., 2007).

En una investigación por encontrar solución a las enfermedades diarreicas se probaron serogrupos de *Vibrio cholerae* 01, 0139 y no-01, no-0139 para evaluar la actividad antibacteriana del Neem usada en la medicina tradicional india para el tratamiento de diarrea y cólera. Se realizó una prueba de susceptibilidad antibiótica para confirmar la resistencia a diferentes drogas. Todos los *Vibrio cholerae* incluidos en el estudio mostraron resistencia a múltiples drogas. El extracto crudo de metanol de las hojas del Neem mostraron actividad inhibitoria contra *Vibrio cholerae* pertenecientes a los serotipos 01,0139 y no-01, no-0139 por ensayo de agar difusión, así, el extracto de planta en este estudio mostró actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae multiresistente* a drogas. Así mismo la administración del extracto de Neem no produjo ningún signo de toxicidades los ratones tratados. Los ratones fueron administrados con inóculos orales de *Vibrio cholerae* a una dosis de 1×10^9 CFU, los cuales mostraron acumulación de fluido y hemorragia en los intestinos. Sin embargo, se encontró que el extracto en dosis orales de 450mg/kg inhibía la secreción de fluido (57% de inhibición) y la hemorragia en los intestinos inducida por las cepas de *Vibrio cholerae*. Estos resultados indican que el extracto metanólico reduce significativamente la secreción de fluido y hemorragia inducida por *Vibrio cholerae* en los intestinos del ratón. El extracto de Neem puede ser usado como una fuente potencial en el desarrollo antimicrobial y tratamiento de cólera y diarrea (Thakurta, 2007).

6.- PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

El objetivo principal de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos es determinar si la etiología bacteriana en cuestión es capaz de expresar resistencia a los agentes antimicrobianos posibles como opciones terapéuticas para manejar la infección (Bailey y Scout; 2004).

El estudio de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de los microorganismos patógenos, puede realizarse a través de diversos métodos, el de uso más común por los laboratorios de microbiología es el de difusión en agar, estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido y algunos fastidiosos. El método estandarizado y recomendado por el NCCLS se basa en el descrito originalmente por Bauer, que obtiene resultados cualitativos que correlacionan bien con los resultados cuantitativos obtenidos mediante determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), (Cona, 2002). Los

componentes de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, estandarizados y controlados, son los siguientes:

- El tamaño del inóculo
- El medio de desarrollo (Mueller – Hinton)
- pH
- La atmósfera de incubación
- La temperatura de incubación
- La duración de incubación
- Las concentraciones de antimicrobianos probadas (Bailey y Scout; 2004)

El medio base recomendado para realizar un antibiograma por difusión es el agar Mueller Hinton por: Su reproducibilidad aceptable, baja concentración de inhibidores, condición crítica para evaluar sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclina, el crecimiento satisfactorio de patógenos no fastidiosos (Cona, 2002).

Estándar de turbidez (etazón Mc Farland). Un Mc Farland 0.5 corresponde a un desarrollo de 1.5×10^8 UFC/ml, se tiene que verificar la densidad mensualmente (absorbancia a 625 nm = 0.08 a 0.10), la turbidez del debe ser uniforme post agitación (Cona, 2002).

II JUSTIFICACIÓN

- El presente trabajo es el primer estudio donde se correlaciona la actividad hemaglutinante (presencia de lectinas) y la actividad antibacteriana en plantas medicinales Mexicanas.
- Hasta donde sabemos, no existen reportes comparativos en donde se analicen extractos crudos y fracciones proteicas contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas.

III HIPOTESIS

Las proteínas contenidas en plantas medicinales con actividad hemaglutinante participan en la actividad antibacteriana.

IV OBJETIVOS

A) OBJETIVO GENERAL

Demostrar la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales

B) OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar la actividad hemaglutinante de las plantas medicinales.
- 2) Analizar la actividad antibacteriana del extracto crudo y fracciones proteicas de las plantas medicinales sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas, por el método de kirby-Bauer.
- 3) Analizar la actividad antibacteriana de los pigmentos de las plantas medicinales sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas, por el método de kirby-Bauer.
- 4) Analizar la actividad antibacteriana por medio de densitometría (número de bacterias), de las plantas medicinales sobre bacterias Gramnegativas y Grampositivas.
- 5) Analizar el tipo de efecto sobre bacterias patógenas.

V MATERIAL

- 1) Material Biológico: Plantas medicinales: Infusión de hojas de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), Gobernadora (*Larrea tridentata*), Neem (*Azadirachta indica*), Ruda (*Ruta graveolens*), Flor de Manita (*Chirantrodendron pentadactylon*).
- 2) Cepas ATCC de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*).
- 3) Cepas Tipo: *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus saprophyticus*

NOTA: Las cepas ATCC y las de aislados fueron donadas amablemente por El QFB Ricardo Vega Tavera, Del Departamento de Microbiología de La Facultad de QFB. UMSNH.

- 4) Reactivos con grado analítico

VI METODOS

1) OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO

Para la obtención del extracto crudo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), Gobernadora (*Larrea tridentata*), Ruda (*Ruta graveolens*), Neem (*Azadirachta indica*) y Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), se realizó una infusión que se elaboró utilizando 500g peso seco de las flores u hojas que se hirvieron en 1L de agua desionizada por 15 min. a 100°C. Posteriormente se homogeneizó, se filtró y centrifugó a 3500 rpm X 30 min, al sobrenadante se le llamó extracto crudo (EC), el cual se conservó en refrigeración a 4°C hasta su uso ulterior.

2) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

El método por el que se determinaron las proteínas fue el de Bradford MM, 1976, el cuál se basa en la unión del colorante Coomassie G-250 azul a la proteína presente en la muestra, la cuantificación de proteínas se obtiene al leer la absorbancia a 595 nm, al interpolarla en una curva patrón (0-10mg/mL).

3) PURIFICACION DE LA FRACCION PROTEICA (FP)

Fue proporcionado por la Doctora Bertha Fenton, en breve, al Extracto Crudo se le extrajo los pigmentos utilizando acetona realizando como mínimo tres lavados hasta que la cetona se observe transparente, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en buffer.

4) PURIFICACIÓN DE LECTINAS

Fueron proporcionadas por la Doctora Bertha Fenton, en breve, la técnica de purificación consistió en precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio seguidas de cromatografías secuenciales de diferentes tipos que permitieron la obtención de una proteína pura.

5) ENSAYO DE HEMAGLUTINACION

Se realizó utilizando un panel de fenotipo conocido, formado por los siguientes tipos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O), donado por el Banco Central de Sangre, IMSS México. Este ensayo se desarrollo en placas de 96 pozos (Corning Incorporated NY 14831) utilizando el proceso de dilución serial (Debray y col., 1981). Los resultados se expresan como unidades de hemaglutinación y como actividad específica. Una unidad de hemaglutinación se define como la cantidad de lectina capaz de aglutinar y por lo tanto precipitar el 75 % de los eritrocitos en suspensión después de 60 min. (Bonay y Fresno, 2000). Las unidades de hemaglutinación se obtienen en la última dilución en la que se observa aglutinación, la actividad específica se expresa como el resultado de las unidades de hemaglutinación/mg proteína. La concentración mínima de proteínas necesaria para producir hemaglutinación se obtiene con la última dilución que conserva la actividad. El ensayo se desarrolló con un control negativo (carente de hemaglutinación) y con uno positivo (con una fuente hemaglutinación), se utilizó un extracto crudo de esponja (Fenton NB y col., 2003).

6) PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN CON DISCOS (MÉTODO DE KIRBY-BAUER)

Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos a los extractos se empleó el método de difusión radial en medio Mueller-Hinton según recomendaciones del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) utilizando para ello discos embebidos del extracto. Esta técnica estandarizada por la NCCLS está basada en el conocido método de Kirby-Bauer. Este método de difusión se basa en que el compuesto a estudiar difundirá por el medio agarizado produciendo un gradiente de concentración, entonces si el compuesto es efectivo contra el microorganismo probado se formará una zona de inhibición alrededor del disco embebido en el compuesto. El tamaño de la zona de inhibición proporciona indicios de la relativa actividad de la sustancia (Nidia y col., 2006; Bailey y Scout, 2004; Koneman, 2000).

Para las pruebas de evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos, fueron utilizadas placas de petri que contenían 19 mL de agar Muller-Hinton. En cada placa se distribuyeron equidistantemente sensidiscos estériles (papel filtro). La

suspensión de cada microorganismo se realizó en caldo de Mueller-Hinton en la escala de Mac Farland. Las placas fueron incubadas en estufa a 37 °C por 24 horas (Bailey y Scout, 2004; Koneman, 2000).

Para la preparación del inóculo se tomó una asada de la bacteria en estudio (previamente activada) y se suspendió en una porción de caldo Mueller-Hinton, hasta lograr una turbidez comparable al patrón de turbidez 0.5 Mc Farland, esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuente de luz adecuada. Se embebió el disco con esta preparación y se colocaron en las placas Mueller-Hinton, estas placas se prepararon con 19 ml cada una del medio agarizado Mueller-Hinton (Nidia y col., 2006; Maguna y col., 1999).

Para la distribución uniforme del inóculo en las placas se empapó un hisopo con la escala MacFarlan y se realizó un barrido en por lo menos 3 direcciones, girando la placa a 90°. A continuación se aplicaron en cada placa, con la ayuda de una pinza estéril y ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio, 4 discos periféricos de papel embebidos con el extracto y uno más central embebido con DMSO como control negativo. Se incubaron por 24 horas, la lectura fue realizada por la medición del diámetro del halo de la zona de inhibición (Nidia y col., 2006; Maguna y col., 1999).

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI).

Los métodos de dilución pueden realizarse en medio sólido (dilución en agar) ó en medio líquido (dilución en caldo). Diluciones dobles seriadas del extracto crudo de las planta se enfrentan con una suspensión bacteriana (1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50).

La menor concentración de antibiótico (expresada en unidades/mL ó µg/mL) que impide el crecimiento *in Vitro* de las bacterias se conoce como Concentración mínima inhibitoria (CMI).

El medio normalmente utilizado es el de Mueller-Hinton. En la determinación de la CMI mediante el método de dilución en caldo, se observará que no hay desarrollo de microorganismos (ausencia de turbidez) hasta llegar a una dilución a partir del cuál comienza a haber un aumento de turbidez (desarrollo bacteriano).

7) ANALISIS DEL NÚMERO DE BACTERIAS

El número de bacterias se determinó por medio de densitometría, el ensayo se realizó con modificaciones al método descrito por Annuk y col, 2001. Se desarrollo en placas de 96 pozos (Corning Incorporatedd NY 14831), utilizando diluciones seriales. Se utilizaron controles: negativo (únicamente medio de cultivo), positivo (únicamente bacterias) y muestras a probar (muestras de plantas con diluciones seriales y concentraciones constantes de bacterias). El crecimiento bacteriano se evaluó a las 0 horas, 5 horas, 24 horas, 48 horas, realizando una medición con 450 nm. El valor inicial debe encontrarse entre 0.8 y 1.2 que indican aproximadamente 1×10^8 bacterias.

8) ANALISIS DE AGLUTINACION

Para confirmar si el extracto presentaba solamente un efecto antibacteriano (lisis), si presentaba una aglutinación de las bacterias, o si no tenía efecto sobre las bacterias (aisladas), se realizaron preparaciones de las bacterias y plantas estudiadas que se encontraban en diluciones menores a la CIM.

Las preparaciones se realizaron con 20 μ L, se fijaron y se fueron teñidas con tinciones Gram (HYCEL GRAM COLORANTES Cat. 541). Posteriormente fueron estudiadas utilizando un microscopio ZEIZZ. Las micrografías se tomaron con aumentos de 100X utilizando el programa Axio Vision.

VII RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos al analizar cada planta contra las bacterias patógenas descritas anteriormente en Material.

JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*)

- ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

Para determinar la presencia de lectinas en el extracto crudo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), se llevó a cabo un ensayo de hemaglutinación empleando los cuatro tipos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B, O), el ensayo también presenta un control negativo y un control positivo para comprobar la existencia de lectinas en esta planta.

Tabla 6. Actividad del extracto crudo de Jamaica.

Grupo sanguíneo	UHA	AE	C
A ₁	1760 ± 480	3142 ± 784	35 ± 12
A ₂	4480 ± 640	8000 ± 1085	12 ± 2
B	4480 ± 640	8000 ± 1232	12 ± 3
O	2800 ± 1341	5000 ± 2377	58 ± 31

Los resultados representan la media ± DE (n=7) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante del extracto crudo con los cuatro grupos sanguíneos.

UHA: unidades de hemaglutinación, AE: actividad específica (UHA/Concentración de proteína mg/mL), C: concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL.

Proteína: 0.56 ± 0.01 mg/mL

En la Figura 4, se esquematiza la actividad específica del extracto crudo de Jamaica utilizando los diferentes grupos sanguíneos (A₁, A₂, B, O), se observa que los carbohidratos presentes en el grupo sanguíneo A₁ aparentan una menor actividad que con el resto de los grupos, sin embargo en el análisis estadístico se comprobó que esta diferencia no es significativa.

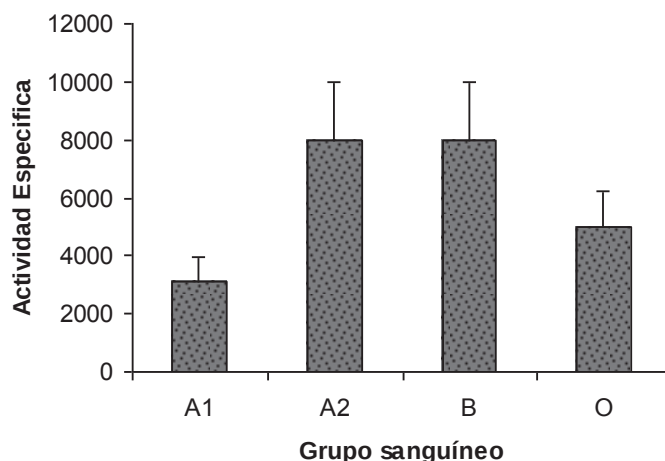


Figura 4. Actividad específica del extracto crudo de Jamaica. Los resultados representan la media $\pm$ DE (n=4) de ensayos independientes por duplicado. La mayor cantidad se observa con los grupos sanguíneos A₂, B y O.

Una vez demostrada la presencia de lectinas en la jamaica y cubriendo el primer objetivo se procedió a analizar si esta planta presenta actividad antibacteriana.

- **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Se realizó como se indica en métodos y siguiendo todas las recomendaciones del método Kirby- Bauer. Se realizó con el extracto crudo de Jamaica y con las siguientes bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los resultados se muestran en la Tabla 7 donde se observar que el extracto crudo de Jamaica no presenta actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ya que no se observaron halos de inhibición. Mientras que para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observó inhibición del crecimiento (Figura 5). Presentando una CIM de 63 μ g/mL para *Escherichia coli*, y de 0.16 μ g/mL para *Staphylococcus aureus*.

Tabla 7. Actividad antibacteriana del Extracto Crudo de Jamaica.

Planta	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	0.98 $\pm$ 0.09	0.82 $\pm$ 0.04	—

Los resultados representan la actividad antibacteriana evaluada por medio de halos de inhibición (mm). Los valores representan la media $\pm$ DE (n=4) de ensayos independientes. No presentó actividad: —.

Para excluir la posibilidad de que los resultados obtenidos anteriormente se debieran a los pigmentos y no a las proteínas contenidas en el extracto crudo, se realizó el mismo estudio ahora utilizando los pigmentos de jamaica. Sorprendentemente, los resultados mostraron que no tiene actividad antibacteriana, lo que se muestra en la Figura 6.

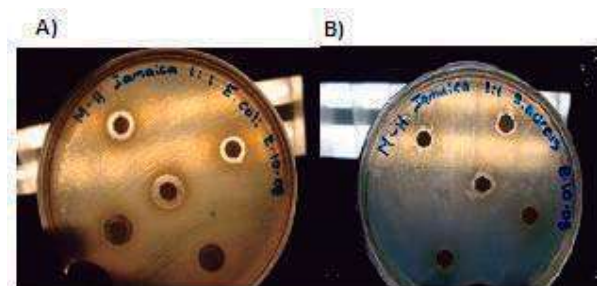


Figura 5. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Jamaica. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ambos muestran un halo de inhibición provocado por el extracto crudo de Jamaica. En cada caso la inhibición fue expresada en mm.

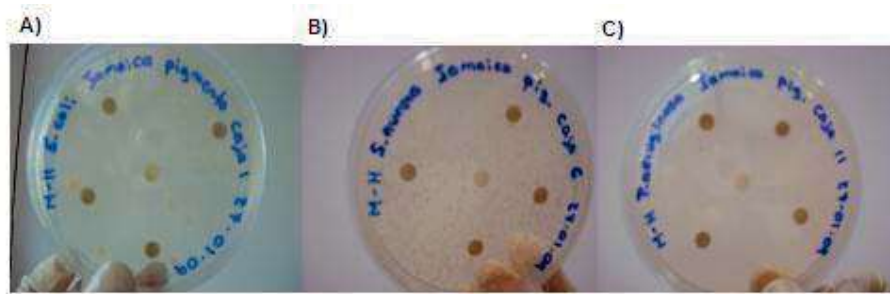


Figura 6. Actividad antibacteriana de los pigmentos de jamaica. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ninguna de las bacterias presenta halos de inhibición. En cada caso se utilizó en el centro un control negativo con DMSO.

- ANÁLISIS DE AGLUTINACIÓN Y NÚMERO DE BACTERIAS

Para corroborar los resultados antes mencionados, se decidió analizar que tipo de efecto ejercen los extractos en las bacterias, por lo que se cuantificó el número de bacterias, mediante absorbancia (Annuk, H., 2001) y se analizó el efecto en base al tiempo.

La figura 7 muestra el efecto inhibitorio de la Jamaica: Extracto Crudo (EC), Jamaica fracción proteica (FP), Lectina de Jamaica y Pigmentos de Jamaica sobre el crecimiento de las diferentes bacterias midiendo a diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48

horas.) de incubación. Los resultados mostraron que la Jamaica tiene efecto contra *E. coli* y contra *S. aureus*., y que este efecto se mantiene hasta las 24 horas, posteriormente las bacterias crecen debido a que se pierde la actividad y además se encuentran en un medio adecuado (Mueller-Hinton). En el caso de la lectina pura de jamaica, solo tiene actividad hasta las 5 horas, perdiendo su actividad en tiempos posteriores, lo que probablemente se deba a que no contiene otras proteínas o carbohidratos que le provean de estabilidad. Con el resto de las bacterias analizadas no presentó actividad. Los pigmentos tampoco tienen actividad. Estos resultados corroboran los resultados anteriores.

Al analizar el efecto en la aglutinación de las bacterias se observó que en el caso de *E. coli* y *S. aureus*, tienen una acción de lisis ya que al analizarlas al microscopio no se observaron bacterias, una vez que disminuye la CIM (0.746 $\mu\text{L/mL}$ para *E. coli* y de 0.613 $\mu\text{L/mL}$ para *S. aureus*), la jamaica todavía presenta efecto aglutinante, como se muestra en la Figura 8, 9 y 10. Es notable que con el resto de las bacterias donde no se observó una lisis, si se presenta una aglutinación.

Después de determinar la CIM se tomo la muestra para la preparación, donde se demuestra en las Figuras 8,9, que este extracto presenta un efecto de aglutinación una vez que ha perdido su efecto de lisis. En el EC se observa aglutinación para todas las bacterias excepto para *Enterobacter aerogenes* en donde se observa que las bacterias se encuentran en forma aislada, mientras que para la FP y lectinas se observa aglutinación para todas las bacterias tratadas.

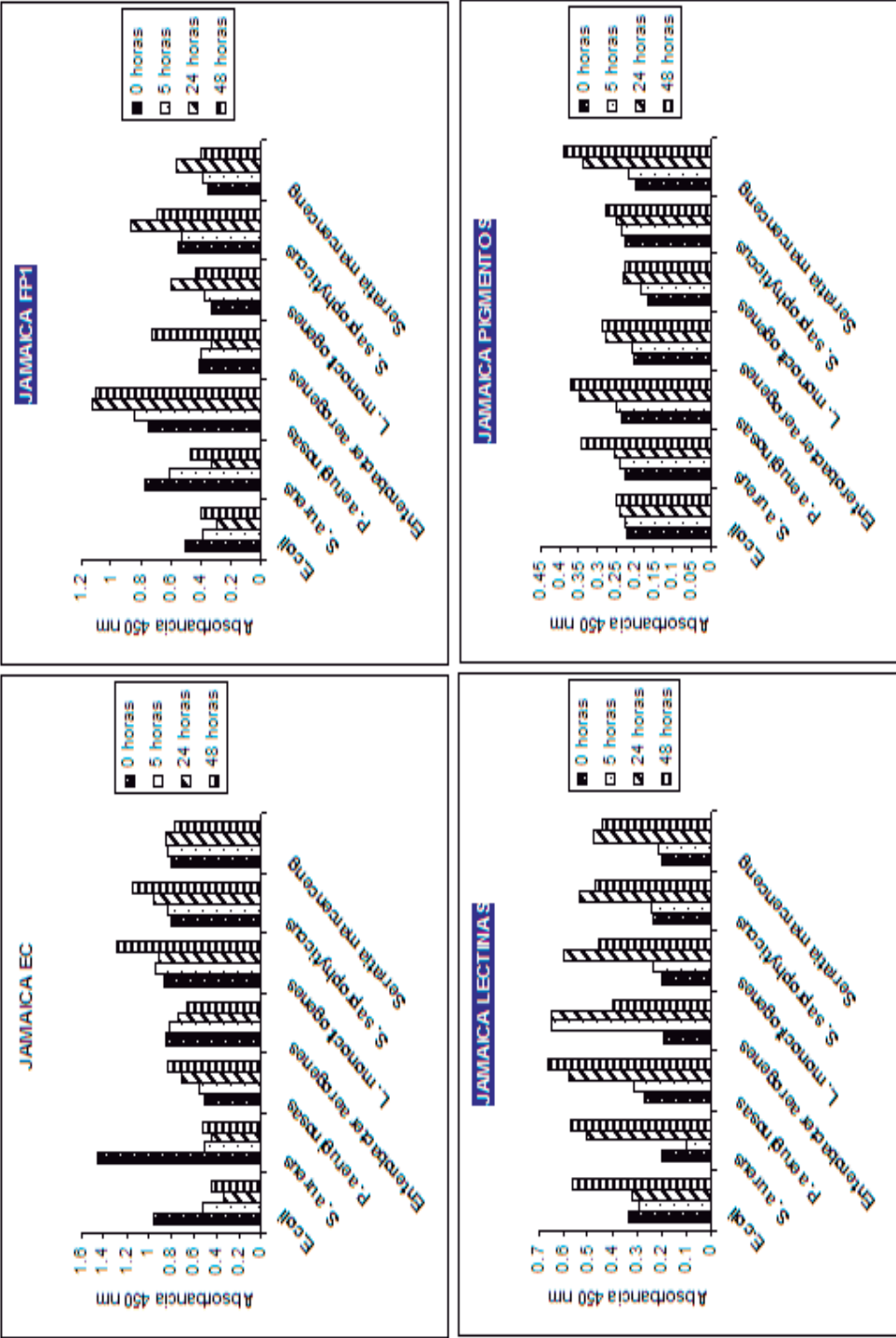


Figura 7. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Jamaica. Muestra el efecto que presenta Jamaica EC, Jamaica FP, Jamaica Lectinas y Jamaica pigmentos, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Serratia marcescens*. A diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas

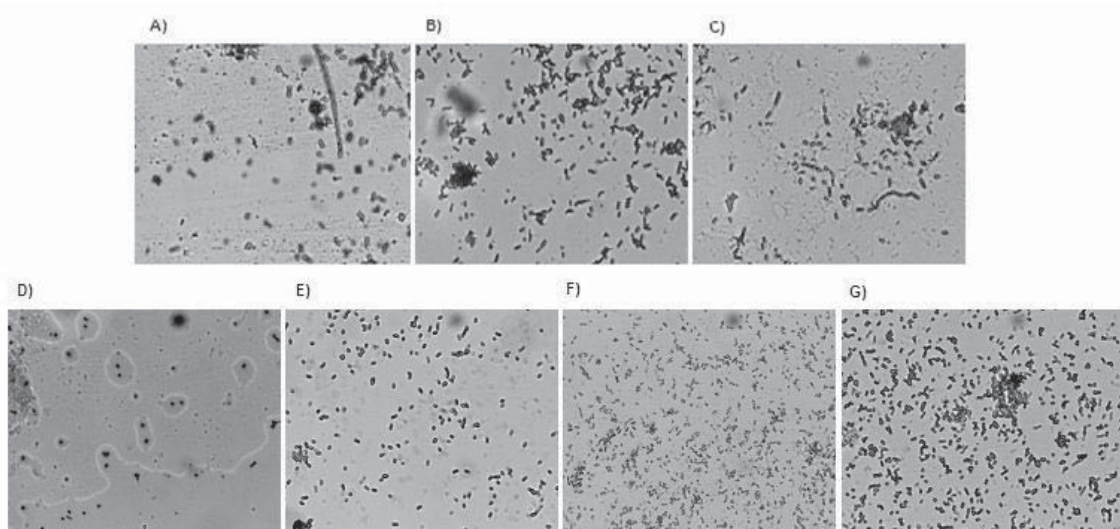


Figura 8. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Jamaica. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.031 µg/mL), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.371 µg/mL), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (0.076 µg/mL), D) *Enterobacter aerogenes* (0.186 µg/mL), E) *Listeria monocytogenes* (0.107 µg/mL), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.503 µg/mL), G) *Serratia marcescens* (0.244 µg/mL).

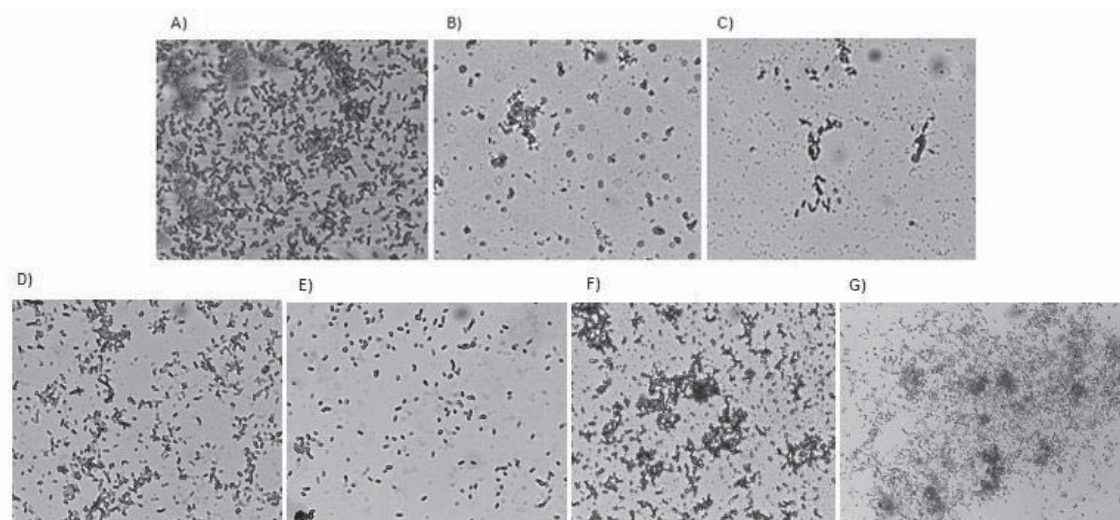


Figura 9. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Jamaica. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.291 µg/mL), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.255 µg/mL), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (0.128 µg/mL), D) *Enterobacter aerogenes* (0.110 µg/mL), E) *Listeria monocytogenes* (0.119 µg/mL), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.617 µg/mL), G) *Serratia marcescens* (0.596 µg/mL).

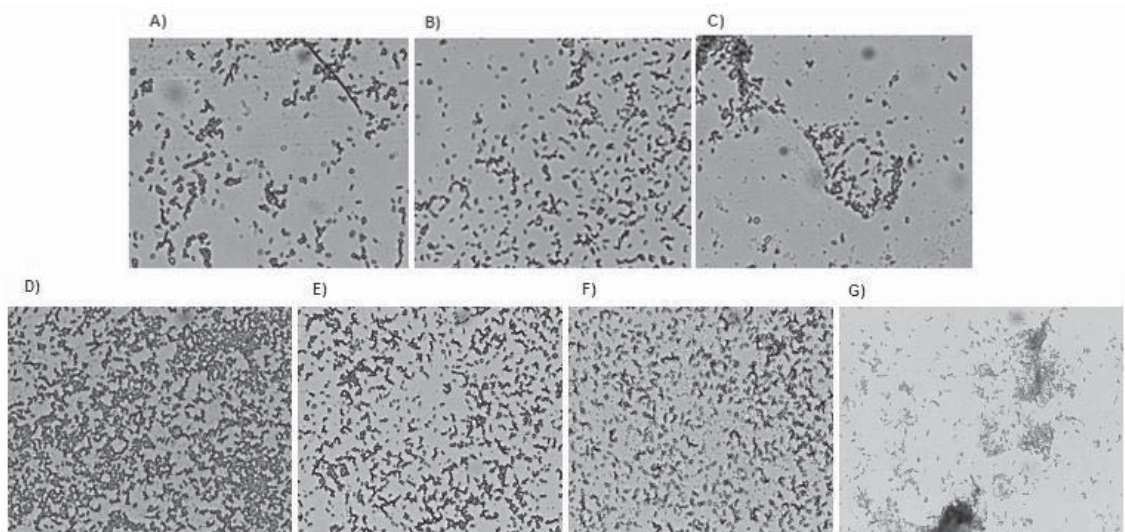


Figura 10. Aglutinación de bacterias por lectinas de Jamaica. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.746 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.613 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (0.364 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (0.219 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (0.243 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.806 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (0.184 $\mu\text{g/mL}$).

GOBERNADORA (*Larrea tridentata*)

- ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

Para determinar la presencia de lectinas en el extracto crudo de Gobernadora (*Larrea tridentata*), se llevó a cabo un ensayo de hemaglutinación empleando los cuatro tipos sanguíneos humanos (A_1 , A_2 , B, O), el ensayo también presenta un control negativo y un control positivo para comprobar la existencia de lectinas en esta planta.

Tabla 8. Actividad del extracto crudo de Gobernadora.

Grupo sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	0	0	0
A_2	0	0	0
B	136553 ± 47296	360580 ± 310416	$0,2 \pm 0,009$
O	20480 ± 17736	15438 ± 7119	$1,39 \pm 0,196$

Los resultados representan la media ($n=4$) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante del extracto crudo con los grupos sanguíneos B y O. UHA: unidades de hemaglutinación, AE: actividad específica (UHA/Concentración de proteína mg/mL), C: concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en $\mu\text{g/mL}$. Proteína: 1.2479 ± 0.2056 mg/mL

En la figura 11, se esquematiza la actividad específica del extracto crudo de Gobernadora utilizando los diferentes grupos sanguíneos (A₁, A₂, B, O), se observa que los carbohidratos presentes en el grupo sanguíneo A₁ y A₂ no presentan actividad, mientras que para el grupo sanguíneo B se observa la mayor actividad, en el caso del tipo sanguíneo O la actividad es estadísticamente diferente.

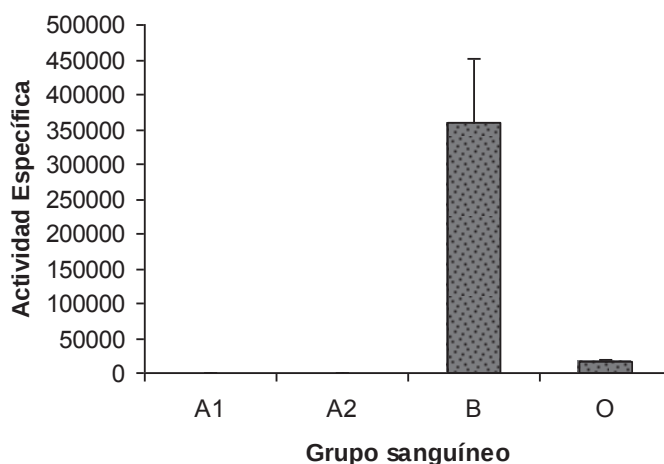


Figura 11. Actividad específica del extracto crudo de Gobernadora. Los resultados representan la media $\pm$ DE (n=4) de ensayos independientes por duplicado. La mayor cantidad se observa con el grupo sanguíneo B.

Una vez demostrada la presencia de lectinas en este extracto procedimos a realizar la actividad antibacteriana.

• ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se realizó con el extracto crudo de Gobernadora y con las siguientes bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los resultados se muestran en la Tabla 9 donde se observa que el extracto crudo de Gobernadora no presenta actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ya que no se observaron halos de inhibición. Mientras que para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observó inhibición del crecimiento (Figura 12). Presentando una CIM de 57 μ g/mL para *Escherichia coli*, y para *Staphylococcus aureus*. La Figura 13 muestra que no se observó inhibición bacteriana de *E. coli* y *P. aeruginosa* al utilizar los pigmentos extraídos de la Gobernadora, mientras que para *S. aureus* si se observa inhibición bacteriana, estos resultados son los primeros reportados en la literatura.

Tabla 9. Actividad antibacteriana del Extracto Crudo de Gobernadora

Planta	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.
<i>Larrea tridentata</i>	1.34 ± 0.10	1.36 ± 0.10	----

Los resultados representan la actividad antibacteriana evaluada por medio de halos de inhibición (mm). Los valores representan la media ± DE (n=4) de ensayos independientes. No presentó actividad: —.

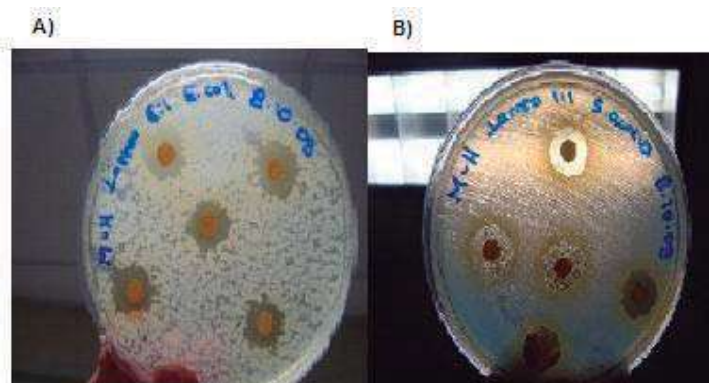


Figura 12. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Gobernadora. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ambos muestran un halo de inhibición provocado por el extracto crudo de Gobernadora. En cada caso la inhibición fue expresada en mm.

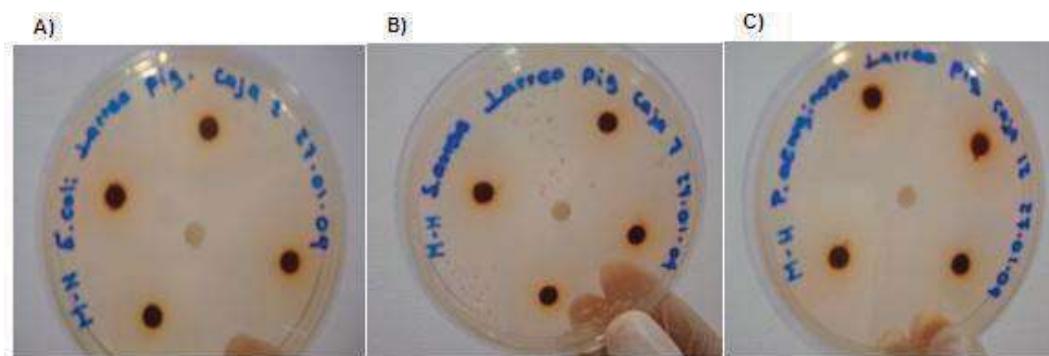


Figura 13 Actividad antibacteriana de los pigmentos de Gobernadora. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ambas bacterias no presenta halos de inhibición. B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observa inhibición de crecimiento en los 4 sensidiscos. En cada caso se utilizo en el centro un control negativo con DMSO.

- **ANALISIS DE AGLUTINACION Y NUMERO DE BACTERIAS**

El efecto inhibitorio de la Gobernadora extracto crudo (EC), Fracción proteica de Gobernadora (FP) y los pigmentos de Gobernadora sobre el crecimiento de las diferentes bacterias cuantificando el numero de bacterias (absorbancia) a diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas.) de incubación. Como se puede observar en la figura 14 se muestra que el extracto crudo inhibe a todas las bacterias estudiadas de 5 a 48 horas.

En la fracción proteica se observa que se inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes*, y *Staphylococcus aureus* a las 5 horas, mientras que con *Serratia marcescens* a las 24 horas, y para *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* se observó el efecto hasta las 48 horas.

Los pigmentos se observa inhibición en *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Serratia marcescens* hasta las 48 horas y para *S. aureus* se observó inhibición sólo hasta las 24 horas, mientras que para *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* y *Staphylococcus saprophyticus* no presentaron inhibición, lo que nos indica que su efecto inhibitorio se debe a las proteínas (lectinas).

Como se describió anteriormente, la gobernadora presenta una actividad antibacteriana contra todas las bacterias estudiadas. Sin embargo, la sensibilidad observada varió en base a la bacteria ya que cubierta la dosis inhibitoria mínima se observo que todavía presenta actividad aglutinando a las diferentes bacterias. Siendo el mínimo concentración de 1.087 µg/mL y el máximo de 3.106 µg/mL.

Lo que se comprobó con microscopía ya que todas las bacterias se encontraban lisadas. En el caso del extracto crudo el efecto en la aglutinación de las bacterias se observa que todas las bacterias tratadas, una vez que disminuye la CIM, la gobernadora todavía presenta efecto aglutinante, como se muestra en las Figuras 15, 16. A partir de la CIM se analizó el tipo de efecto que los extractos ejercen en las bacterias, las figuras muestran aglutinación bacteriana ya que la preparación se tomo a partir de donde ya no se observaba lisis, esto es después de determinar la CIM, excepto en *E.coli* y *Enterobacter aerogenes* donde se observa lisis de las bacterias en el EC, y *Enterobacter aerogenes* en la FP, esto probablemente se deba a que en la fracción proteica se tiene una mezcla de proteínas que tienen afinidades para diferentes carbohidratos expresados en las diferentes bacterias.

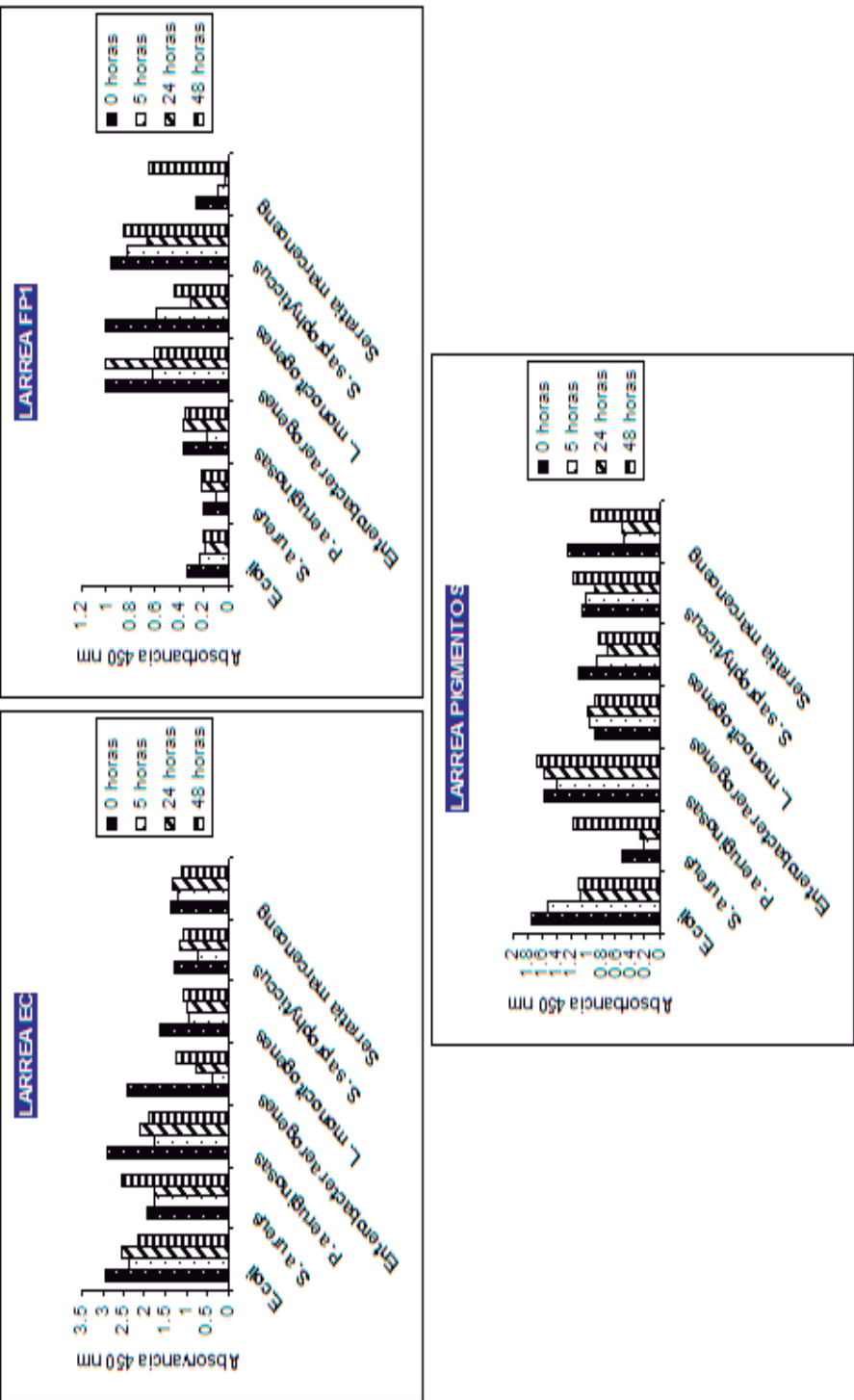


Figura 14. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Gobernadora. Se muestra el efecto que presenta Gobernadora EC, Gobernadora FP y Gobernadora pigmentos, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Serratia marcescens*. A diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas).

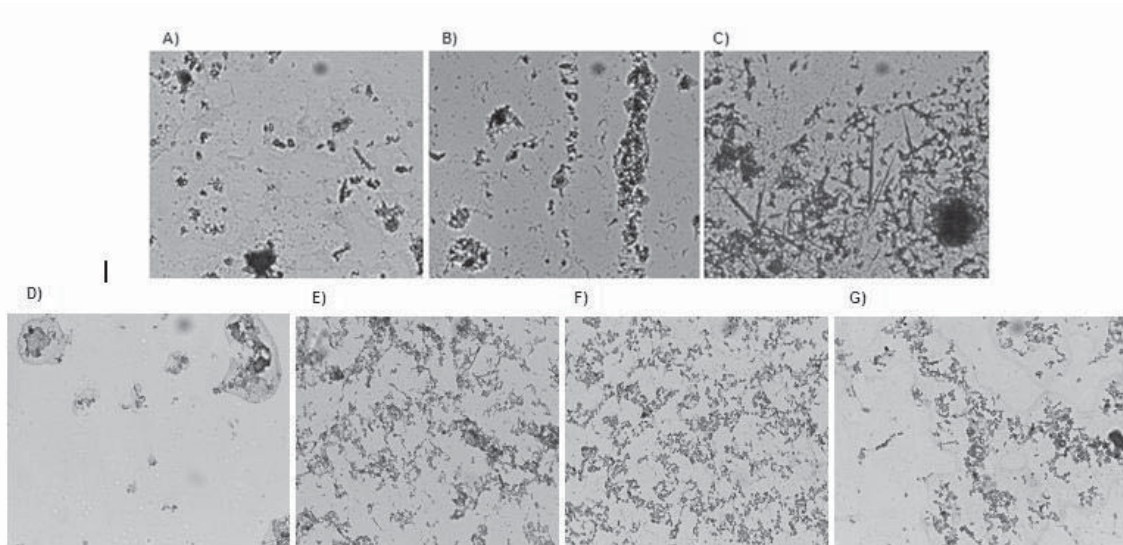


Figura 15. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Gobernadora. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* (0.175 ug/mL), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.087 ug/mL) C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.611 ug/mL), D) *Enterobacter aerogenes* (0.381 ug/mL), E) *Listeria monocytogenes* (0.319 ug/mL), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.547 ug/mL), G) *Serratia marcescens* (0.737 ug/mL).

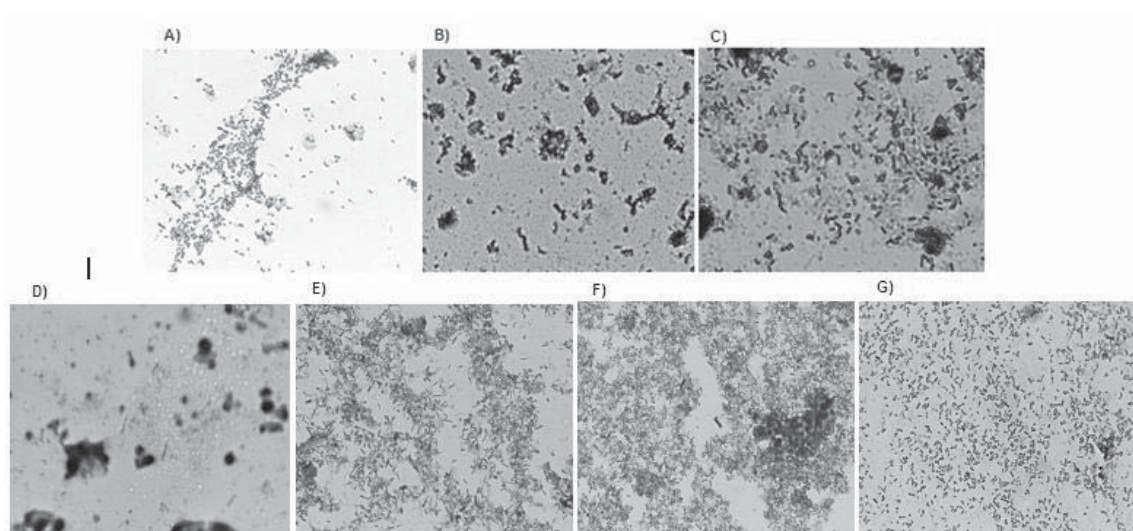


Figura 16. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Gobernadora. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.779 ug/mL), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.991 ug/mL), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.106 ug/mL), D) *Enterobacter aerogenes* (0.678 ug/mL), E) *Listeria monocytogenes* (0.471 ug/mL), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.163 ug/mL), G) *Serratia marcescens* (0.523 ug/mL)

RUDA (*Ruta graveolens*)

- ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

Para determinar la presencia de lectinas en el extracto crudo de Ruda (*Ruta graveolens*), se llevó a cabo un ensayo de hemaglutinación empleando los cuatro tipos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B, O), el ensayo también presenta un control negativo y un control positivo para comprobar la existencia de lectinas en esta planta.

Tabla 10. Actividad del extracto crudo de Ruda.

Grupo sanguíneo	UHA	AE	C
A ₁	0	0	0
A ₂	0	0	0
B	81,920	48,188	0,2
O	0	0	0

Resultados representan la media $\pm$ DE (n=2) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante del extracto crudo con los cuatro grupos sanguíneos. UHA: unidades de hemaglutinación, AE: actividad específica (UHA/Concentración de proteína mg/mL), C: concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en μ g/mL. Proteína: 0.315 mg/mL

En la figura 17, se esquematiza la actividad específica del extracto crudo de Ruda utilizando los diferentes grupos sanguíneos (A₁, A₂, B, O), se observa que los carbohidratos presentes en el grupo sanguíneo A₁, A₂ y O no presentan actividad, como sucede con los carbohidratos presentes en el grupo sanguíneo B que si presentan actividad.

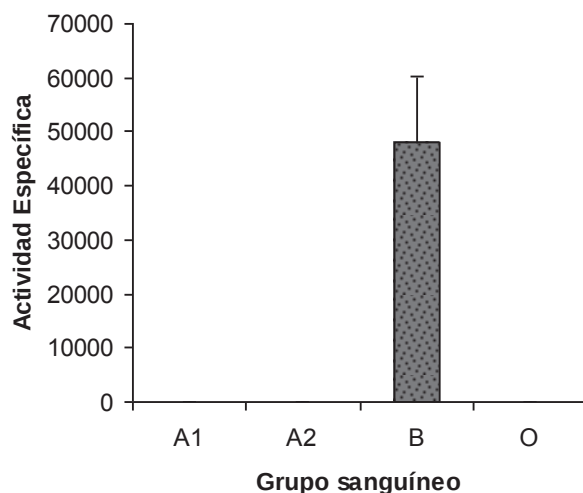


Figura 17. Actividad específica del extracto crudo de Ruda. Los resultados representan la media $\pm$ DE (n=2) de ensayos independientes por duplicado. Sólo se observa actividad con el grupo sanguíneo B.

Una vez demostrada la presencia de lectinas en éste extracto procedimos a realizar la actividad antibacteriana.

- ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se realizó con el extracto crudo de la Ruda y con las siguientes bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los resultados se muestran en la Tabla 11 donde se observa que el extracto crudo de Ruda no presenta actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ya que no se observaron halos de inhibición. Mientras que para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observó inhibición del crecimiento (Figura 18). Presentando una CIM de 13 μ g/mL para *Escherichia coli*, y de 17 μ g/mL para *Staphylococcus aureus*.

Tabla 11. Actividad antibacteriana del Extracto Crudo de Ruda.

Planta	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Ruta graveolens</i>	0.8 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 1.21	---

Los resultados representan la actividad antibacteriana evaluada por medio de halos de inhibición (mm). Los valores representan la media $\pm$ DE (n=4) de ensayos independientes. No presentó actividad: —.

La Figura 19 muestra que no se observó inhibición bacteriana de *E.coli* y *P. aeruginosa* al utilizar los pigmentos extraídos de la Ruda, mientras que para *S. aureus* si se observa inhibición bacteriana.

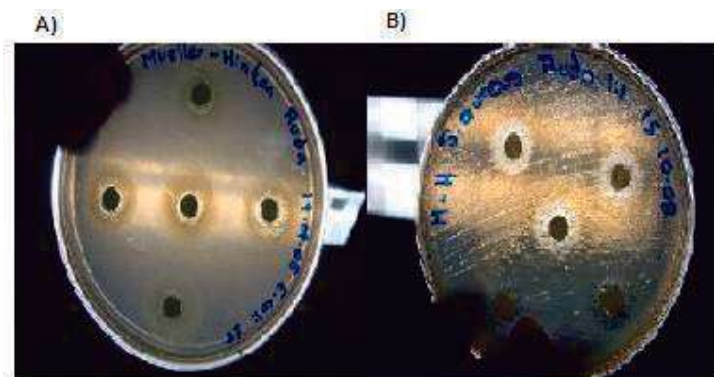


Figura 18. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Ruda. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ambos muestran un halo de inhibición provocado por el extracto crudo de Ruda. En cada caso la inhibición fue expresada en mm.

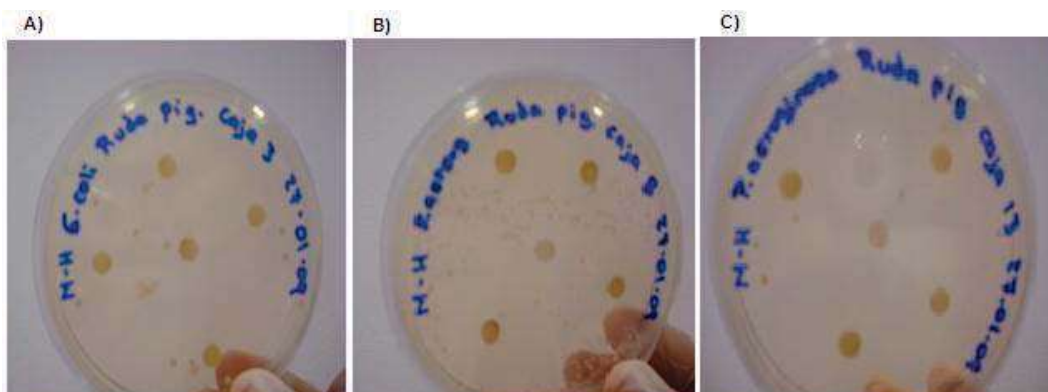


Figura 19. Actividad antibacteriana de los pigmentos de Ruda. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ambas bacterias no presenta halos de inhibición. B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observa inhibición de crecimiento en los 4 sensidiscos. En cada caso se utilizo en el centro un control negativo con DMSO.

• ANALISIS DE AGLUTINACION Y NUMERO DE BACTERIAS

Como se puede observar en la figura 20 se muestra el efecto inhibitorio de la Ruda extracto crudo (EC), Ruda fracción proteica (FP), y Ruda Pigmentos sobre el crecimiento de las diferentes bacterias midiendo a diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas.) de incubación. Se observa que el extracto crudo de la Ruda tiene un mayor efecto sobre *Listeria monocytogenes* ya que se observó la inhibición desde 5 hasta las 48 horas, mientras que para *Staphylococcus aureus* solo lo inhibe hasta las 24 horas, y finalmente

para *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter aerogenes* se observa inhibición de crecimiento a solo hasta las 5 horas, después se presenta un incremento en la absorbancia, por tanto el numero de bacterias incrementa, por lo que se observa que se pierde el efecto inhibitorio, por otro lado, no se observa efecto inhibitorio en *P. aeruginosa* y *Staphylococcus saprophyticus*. Este ensayo corrobora que el extracto crudo de Ruda presenta un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y no en *Pseudomonas aeruginosa*, lo que es congruente con los resultados anteriores de la actividad antibacteriana.

Los resultados observados en la fracción proteica de la Ruda, mostraron los mismos resultados que en el extracto crudo, lo que confirma que las lectinas se encuentran participando en este proceso.

En los pigmentos solo se observa efecto inhibitorio en *S. aureus* y *Serratia marcescens* hasta las 48 horas, mientras que para las demás bacterias tratadas no se observó efecto inhibitorio lo que demuestra que tanto para *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, y *Listeria monocytogenes* el efecto inhibitorio se debe a las proteínas (lectinas).

Lo que se comprobó con microscopía ya que todas las bacterias se encontraban lisadas excepto *P.aeruginosa* y *Staphylococcus saprophyticus* que solo se observa aglutinación. En el caso del extracto crudo el efecto en la aglutinación de las bacterias se observa en todas las bacterias tratadas, una vez que disminuye la CIM, la ruda todavía presenta efecto aglutinante, como se muestra en las Figuras 21 y 22. Se observa que la FP de la Ruda en *Staphylococcus aureus* inhibe totalmente su crecimiento lisando a las bacterias ya que no se observó aglutinación.

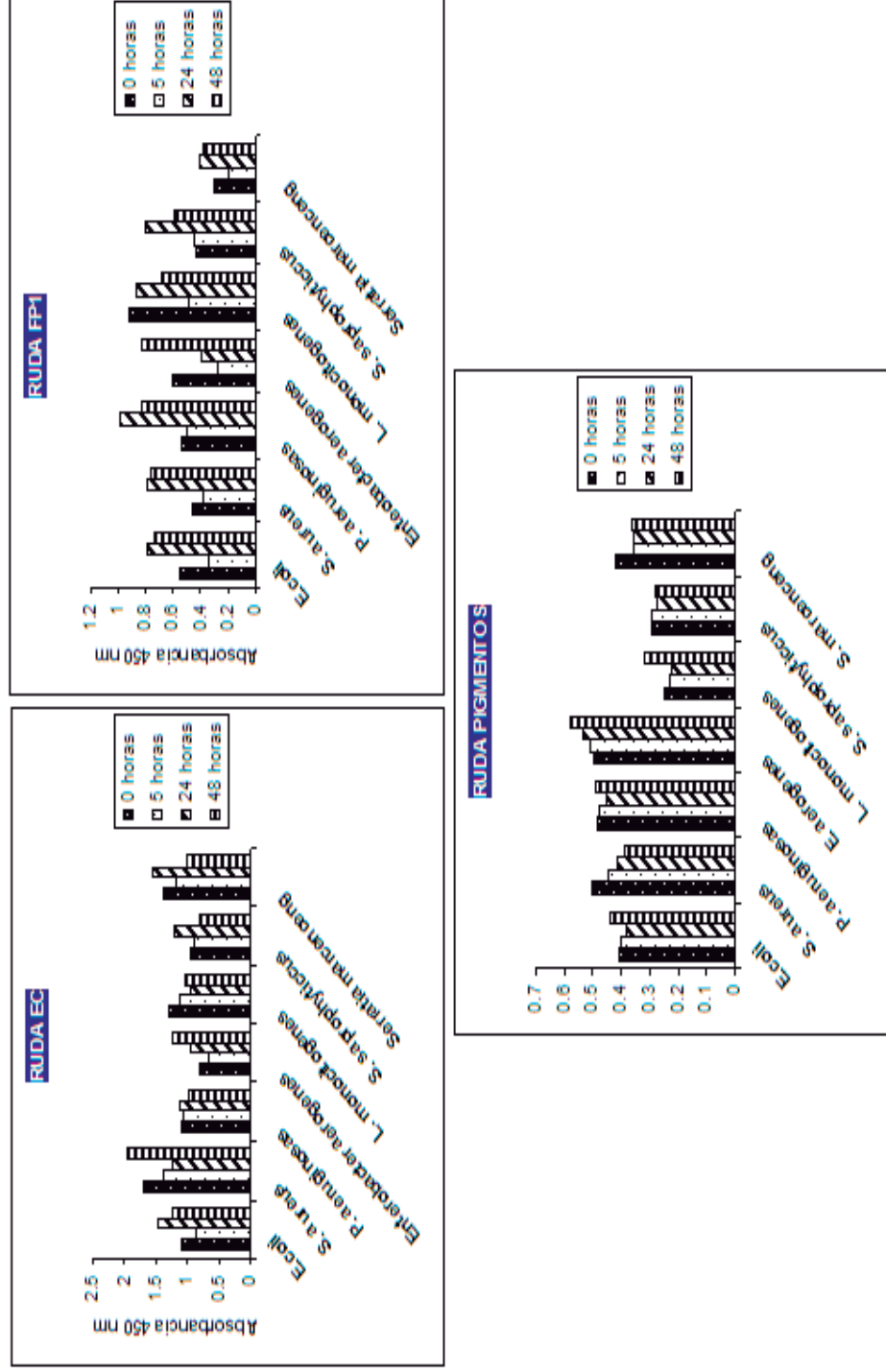


Figura 20. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Ruda. Muestra el efecto que presenta Ruda EC, Ruda FP y Ruda pigmentos, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Serratia marcescens*. A diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas).

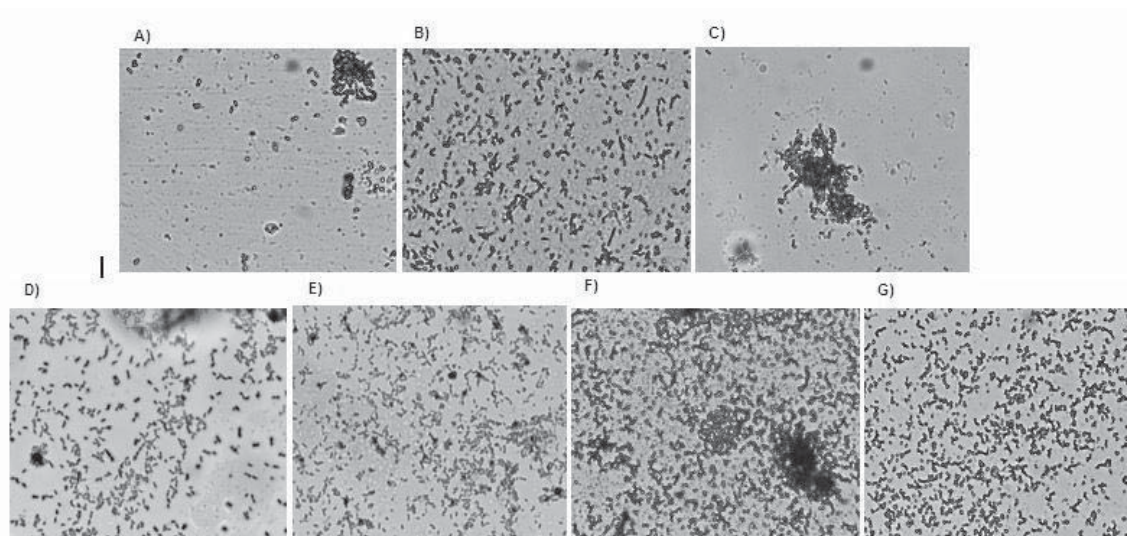


Figura 21. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Ruda. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.327 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.594 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (1.036 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (0.376 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (0.296 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (1.298 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (0.553 $\mu\text{g/mL}$).

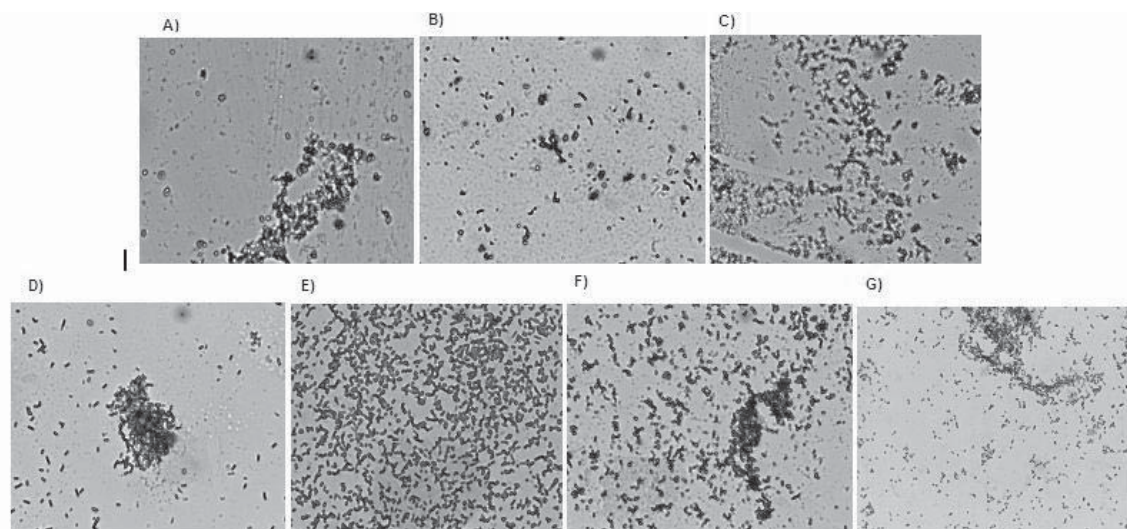


Figura 22. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Ruda. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.080 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.409 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.579 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (0.0062 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (0.554 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.737 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (0.437 $\mu\text{g/mL}$).

NEEM (*Azadirachta indica*)

- ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

La determinación de presencia de lectinas en el extracto crudo de Neem (*Azadirachta indica*) se llevó a cabo un ensayo de hemaglutinación empleando los cuatro tipos sanguíneos humanos (A_1 , A_2 , B, O), el ensayo también presenta un control negativo y un control positivo para comprobar la existencia de lectinas en esta planta.

Tabla 12. Actividad del extracto crudo de Neem.

Grupo sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	12800 ± 10861	33698 ± 28594	4 ± 3
A_2	6400 ± 5430	16849 ± 14297	7 ± 6
B	40960 ± 0	107836 ± 0	0.7 ± 0
O	30720 ± 14481	80877 ± 38125	1 ± 0.5

Los resultados representan la media $\pm$ DE (n=4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante del extracto crudo con los cuatro grupos sanguíneos. UHA: unidades de hemaglutinación, AE: actividad específica (UHA/Concentración de proteína mg/mL), C: concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en $\mu\text{g/mL}$. Proteína: $0.8255 \pm 0.3 \text{ mg/mL}$

En la figura 23, se esquematiza la actividad específica del extracto crudo de Neem utilizando los diferentes grupos sanguíneos (A_1 , A_2 , B, O), se observa que los carbohidratos presentes en el grupo sanguíneo A_2 presentan una actividad significativamente menor que el resto de los grupos. Los grupos sanguíneos B y O mostraron mayor actividad, sin tener diferencias significativas entre estos dos grupos.

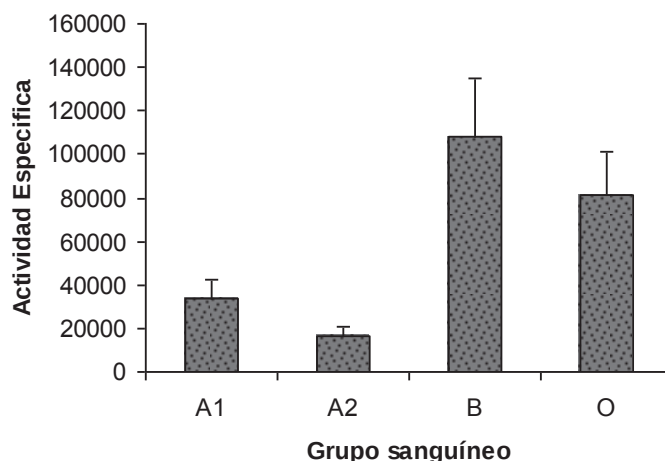


Figura 23. Actividad específica del extracto crudo de Neem. Los resultados representan la media $\pm$ DE (n=4) de ensayos independientes por duplicado. La mayor cantidad se observa con los grupos sanguíneos B y O.

Una vez demostrada la presencia de lectinas en este extracto procedimos a realizar la actividad antibacteriana.

- ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se utilizaron las cepas de referencia utilizadas con las plantas descritas anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 13 donde se observa que el extracto crudo de Neem no presenta actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ya que no se observaron halos de inhibición. Mientras que para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observó inhibición del crecimiento (Figura 24). Presentando una CIM de 35 μ g/mL para *Escherichia coli*, y de 20 μ g/mL para *Staphylococcus aureus*.

Tabla 13. Actividad antibacteriana del Extracto Crudo de Neem.

Planta	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	0.98 $\pm$ 0.09	0.82 $\pm$ 0.04	—

Los resultados representan la actividad antibacteriana evaluada por medio de halos de inhibición (mm). Los valores representan la media $\pm$ DE (n=4) de ensayos independientes. No presentó actividad: —.

De igual forma se determinó la actividad antibacteriana de los pigmentos contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, para poder dilucidar si este efecto observado se debe a los pigmentos o a las proteínas contenidas en este extracto. Como se puede observar en la Figura 25 no se observó inhibición bacteriana.

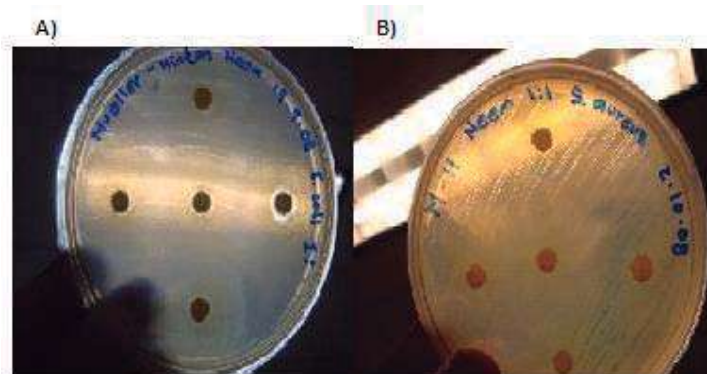


Figura 24. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Neem. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ambos muestran un halo de inhibición provocado por el extracto crudo de Neem. En cada caso la inhibición fue expresada en mm.

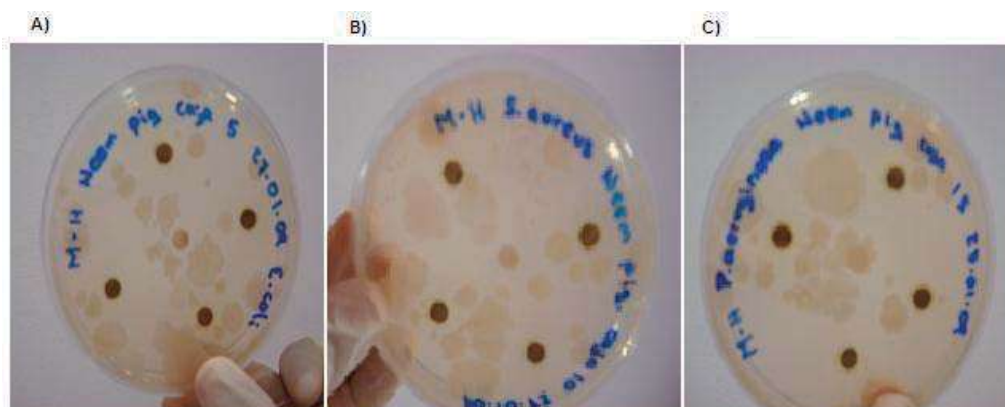


Figura 25 Actividad antibacteriana de los pigmentos de Neem. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ninguna de las bacterias presenta halos de inhibición. En cada caso se utilizó en el centro un control negativo con DMSO.

- **ANALISIS DE AGLUTINACION Y NUMERO DE BACTERIAS**

Como se puede observar en la figura 26 se muestra el efecto inhibitorio del Neem extracto crudo (EC), Neem fracción proteica (FP), Neem lectinas, Neem Pigmentos, sobre el crecimiento de las diferentes bacterias midiendo a diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas.) de incubación. Se observa que el extracto crudo inhibe el crecimiento de *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens* y *Listeria monocytogenes* hasta las 48 horas y para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes* solo se observa inhibición a las 5 horas.

En la FP se observa inhibición de *E. coli* hasta las 48 horas aumentando el tiempo de su efecto, mientras que para *Listeria monocytogenes* y *Serratia marcescens* disminuyó su efecto observándose solo hasta las 5 horas, por otro lado *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* mantienen su efecto hasta las 5 horas. Mientras que para *Staphylococcus saprophyticus* no se observa efecto inhibitorio.

Sin embargo, cuando se analizó el efecto de una lectina de Neem, solo presentó inhibición de crecimiento *Listeria monocytogenes* presentando este efecto hasta las 5 horas, lo que confirma que en el extracto crudo contiene una mezcla de proteínas.

Con los pigmentos se observa inhibición en *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Enterobacter aerogenes* y *Serratia marcescens* a las 48 horas, mientras que para *Staphylococcus saprophyticus* solo se observó efecto inhibitorio hasta las 24 horas, por otro lado para *Listeria monocytogenes* no se observó efecto inhibitorio lo cual nos demuestra que su efecto se debe a las proteínas (lectinas).

Lo que se comprobó con microscopía ya que todas las bacterias se encontraban lisadas En el caso del extracto crudo y lectinas el efecto en la aglutinación de las bacterias se observa en todas las bacterias tratadas, una vez que disminuye la CIM, el Neem todavía presenta efecto aglutinante, como se muestra en las Figuras 27, 28 y 29, en la FP del Neem solo para *Staphylococcus aureus* inhibe totalmente su crecimiento lisando a las bacterias ya que no se observó aglutinación.

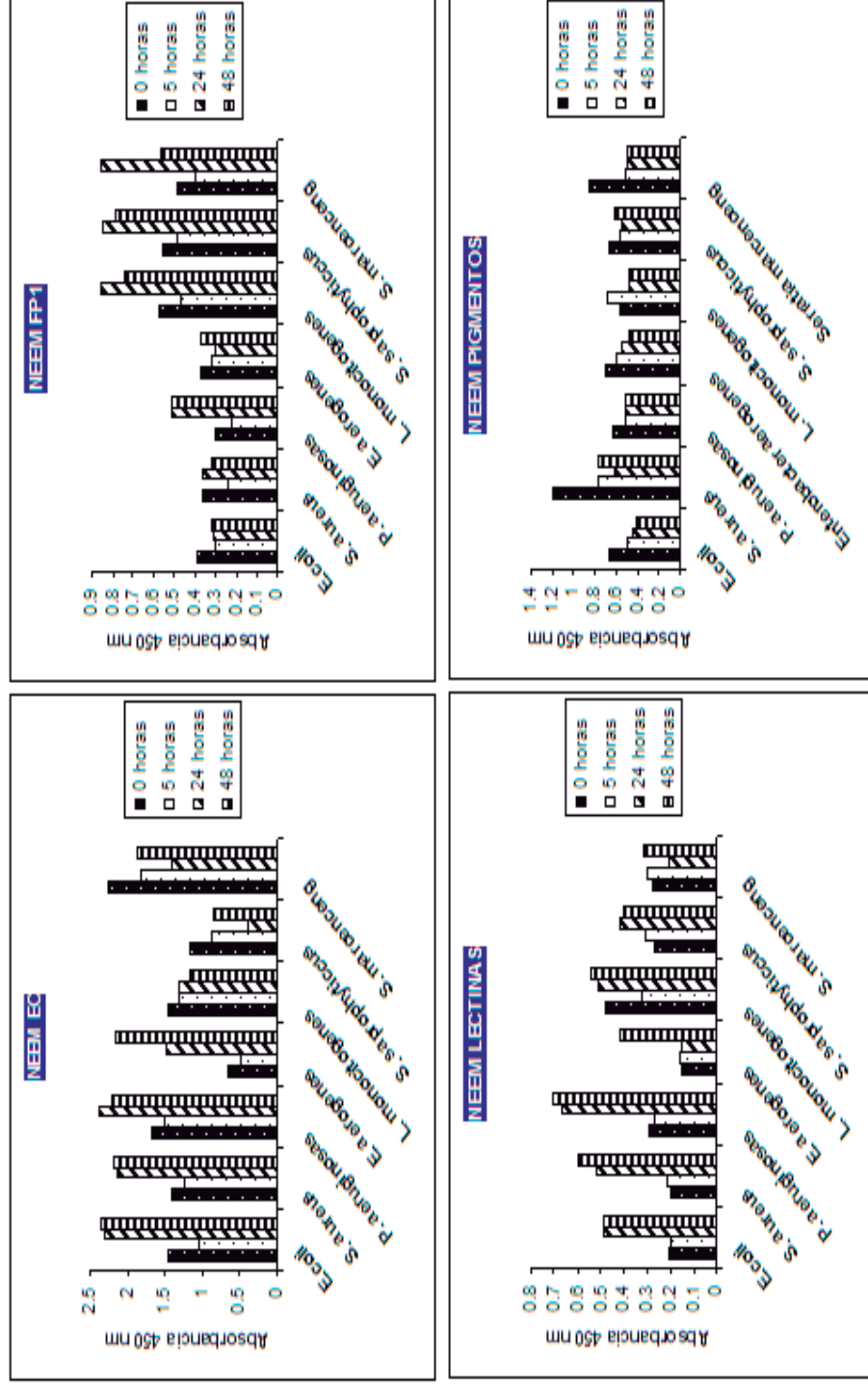


Figura 26. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Neem. Muestra el efecto que presenta Neem EC, Neem FP, Neem Lectinas y Neem pigmentos, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Serratia marcescens*. A diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas).

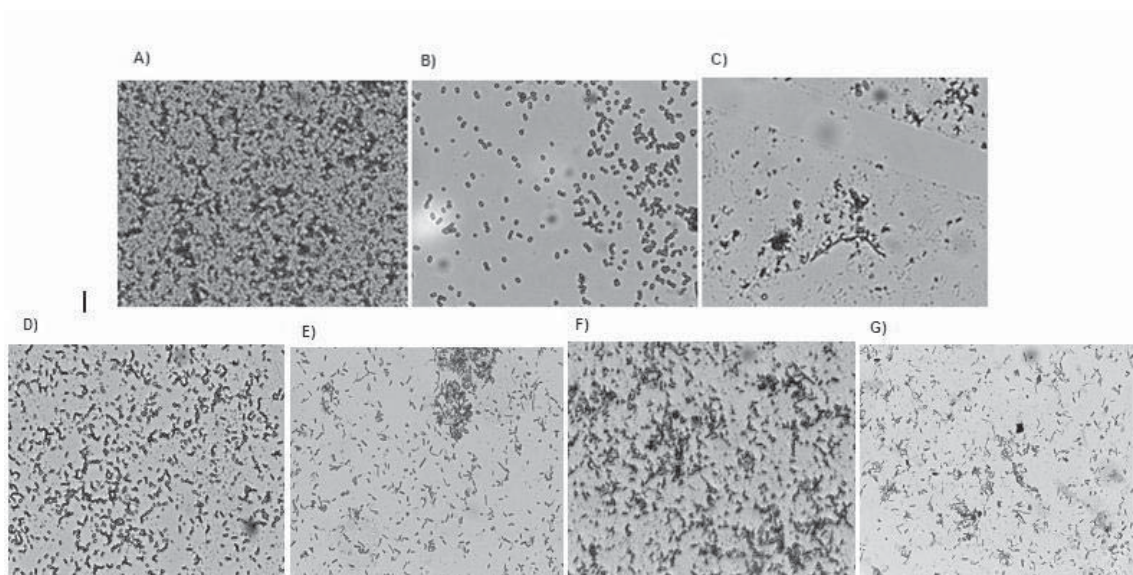


Figura 27. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Neem. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.139 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.474 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.324 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (0.965 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (0.788 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.568 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (0.503 $\mu\text{g/mL}$).

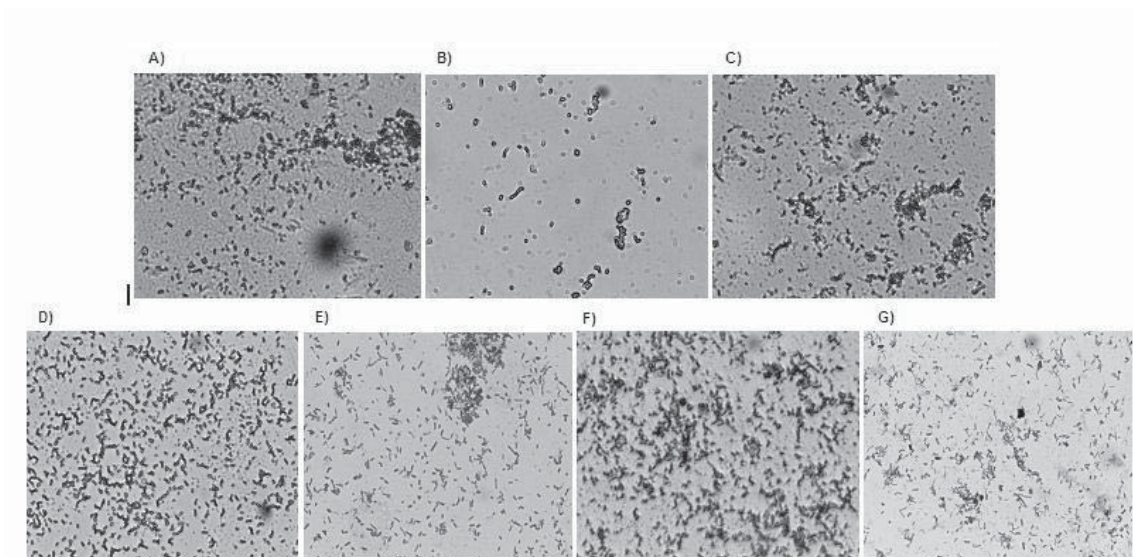


Figura 28. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Neem. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.404 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (1.007 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.742 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (0.693 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (0.839 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (1.062 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (0.339 $\mu\text{g/mL}$).

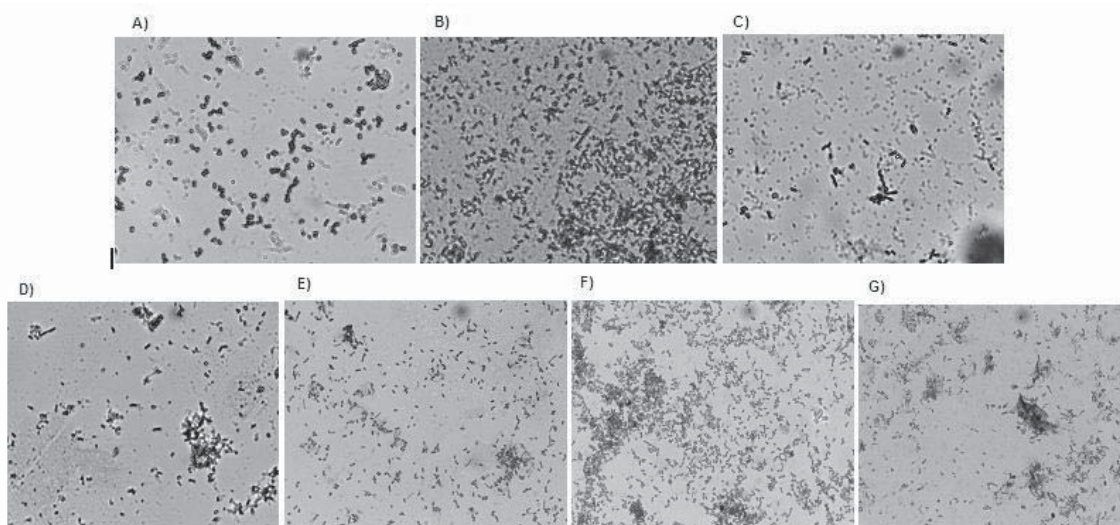


Figura 29. Aglutinación de bacterias por lectinas de Neem. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.138 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.0015 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.039 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (0.077 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (1.048 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.030 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (0.032 $\mu\text{g/mL}$).

FLOR DE MANITA (*Chiranthodendron pentadactylon*)

- ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

Para determinar la presencia de lectinas en el extracto crudo de Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), se llevó a cabo un ensayo de hemaglutinación empleando los cuatro tipos sanguíneos humanos (A_1 , A_2 , B, O), el ensayo también presenta un control negativo y un control positivo para comprobar la existencia de lectinas en esta planta.

Tabla 14. Actividad del extracto crudo de Flor de Manita.

Grupo sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	$22354,28 \pm 30050,72$	$67894,08 \pm 94445,23$	14.34 ± 22.80
A_2	$65874,28 \pm 71839,92$	$373901,06 \pm 763021,02$	9.46 ± 23.39
B	$88502,85 \pm 74472,93$	$431739,52 \pm 746146,47$	1.03 ± 1.86
O	$75337,14 \pm 83017,41$	$389578,85 \pm 762549,26$	1.06 ± 1.44

Los resultados representan la media $\pm$ DE (n=7) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante del extracto crudo con los cuatro grupos sanguíneos. UHA: unidades de hemaglutinación, AE: actividad específica (UHA/Concentración de proteína mg/mL), C: concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en $\mu\text{g/mL}$. Proteína: mg/mL

En la figura 30, se esquematiza la actividad específica del extracto crudo de Flor de Manita utilizando los diferentes grupos sanguíneos (A₁, A₂, B, O), se observa que los carbohidratos presentes en el grupo sanguíneo A₁ aparentan una menor actividad, contrario a lo que ocurre con el grupo sanguíneo B en donde se observa mayor actividad.

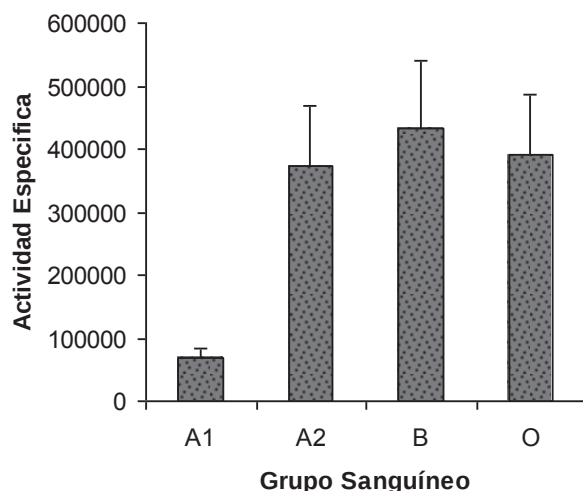


Figura 30. Actividad específica del extracto crudo de Flor de Manita. Los resultados representan la media $\pm$ DE (n=7) de ensayos independientes por duplicado. La mayor cantidad se observa con los grupos sanguíneos A₂, B y O.

Una vez demostrada la presencia de lectinas en este extracto procedimos a realizar la actividad antibacteriana.

- ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Los resultados se muestran en la Tabla 15 donde se observar que el extracto crudo de Flor de Manita no presenta actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ya que no se observaron halos de inhibición. Mientras que para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se observó inhibición del crecimiento (Figura 31). Presentando una CIM de 214 μ g/mL para *Escherichia coli*, y de 7 μ g/mL para *Staphylococcus aureus*.

Tabla 15. Actividad antibacteriana del Extracto Crudo de Flor de Manita.

Planta	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	1.08 ± 0.04	0.86 ± 0.08	—

Los resultados representan la actividad antibacteriana evaluada por medio de halos de inhibición (mm). Los valores representan la media ± DE (n=4) de ensayos independientes. No presentó actividad: —.

De igual forma se determinó la actividad antibacteriana de los pigmentos contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, para poder dilucidar si este efecto observado se debe a los pigmentos o a las proteínas contenidas en este extracto. Como se puede observar en la Figura 32 los pigmentos no tienen actividad antibacteriana, confirmando que las proteínas tienen esta actividad.

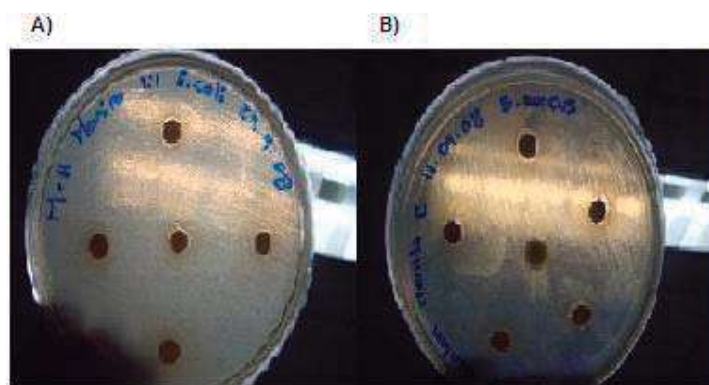


Figura 31. Actividad antibacteriana del extracto crudo de Flor de Manita. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ambos muestran un halo de inhibición provocado por el extracto crudo de Flor de Manita. En cada caso la inhibición fue expresada en mm.

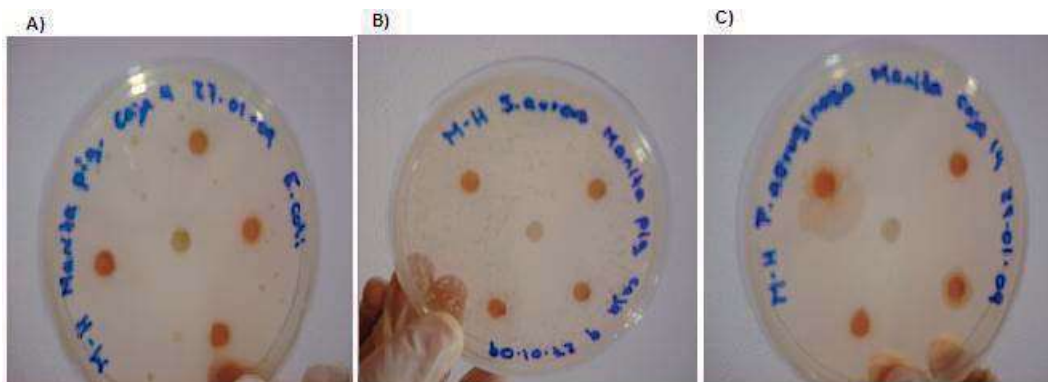


Figura 32 Actividad antibacteriana de los pigmentos de Flor de Manita. A) *Escherichia coli* ATCC 25922, B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ninguna de las bacterias presenta halos de inhibición. En cada caso se utilizó en el centro un control negativo con DMSO.

- ANÁLISIS DE AGLUTINACIÓN Y NÚMERO DE BACTERIAS

Como se puede observar en la figura 33 se muestra el efecto inhibitorio de Flor de Manita extracto crudo (EC), Flor de Manita fracción proteica cetónica, Flor de Manita fracción proteica (FP) y Flor de Manita pigmentos sobre el crecimiento de las diferentes bacterias midiendo a diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas.) de incubación. En el EC y FP cetónica se observa solo inhibición de crecimiento en *Escherichia coli* hasta las 5 horas, mientras que para las demás bacterias tratadas no se observó efecto inhibitorio.

En la fracción proteica no se observó efecto inhibitorio en ninguna de las 4 bacterias tratadas.

En los pigmentos no se observó inhibición de crecimiento en ninguna de las bacterias como se puede corroborar con el método de cuantificación del halo de inhibición. Por lo que nos indica que el efecto inhibitorio en *E. coli* se debe a las proteínas (lectinas).

Lo que se comprobó con microscopía ya que todas las bacterias se encontraban lisadas. En el caso del extracto crudo, fracción proteica cetónica y fracción proteica se observa aglutinación en todas las bacterias tratadas como se muestra en las Figuras 34, 35 y 36.

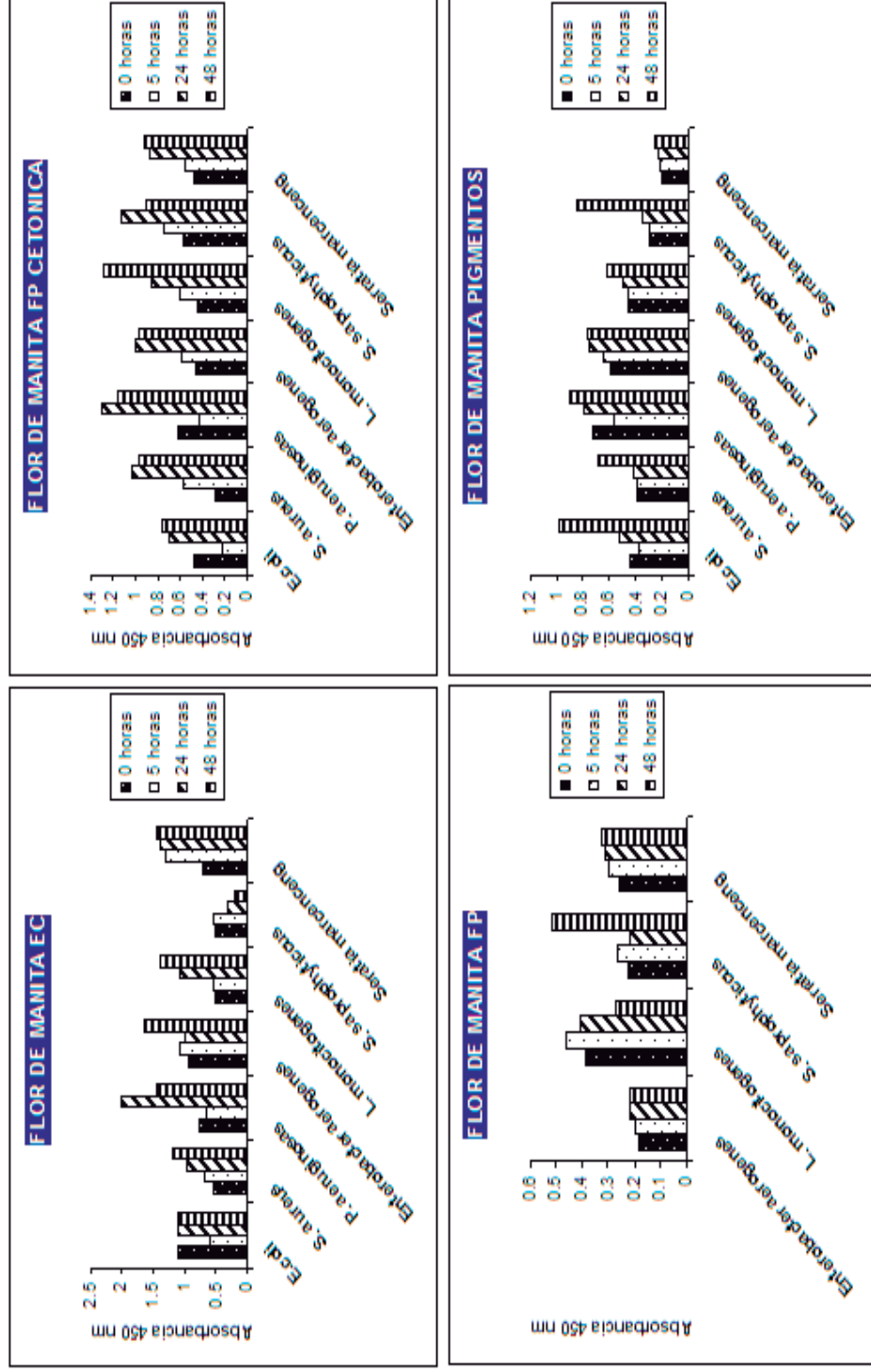


Figura 33. Análisis de número de bacterias y aglutinación de Flor de Manita. Muestra el efecto que presenta Flor de Manita EC, Flor de Manita FP cetonica, Flor de Manita FP y Flor de Manita pigmentos, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Serratia marcescens*. A diferentes tiempos (0, 5, 24 y 48 horas).

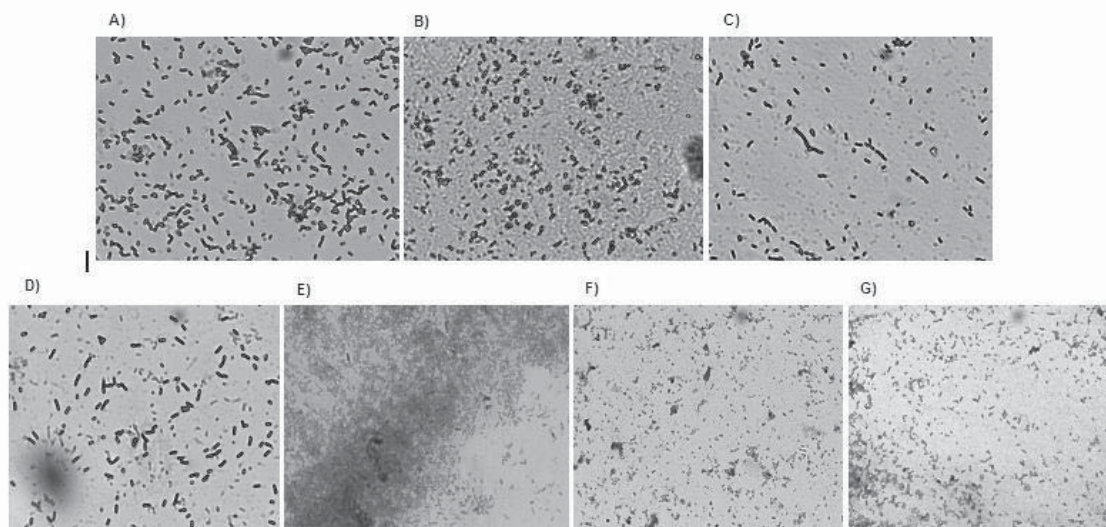


Figura 34. Aglutinación de bacterias por extracto crudo de Flor de Manita. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.896 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.788 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.559 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (0.189 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (0.862 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.927 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (0.957 $\mu\text{g/mL}$).

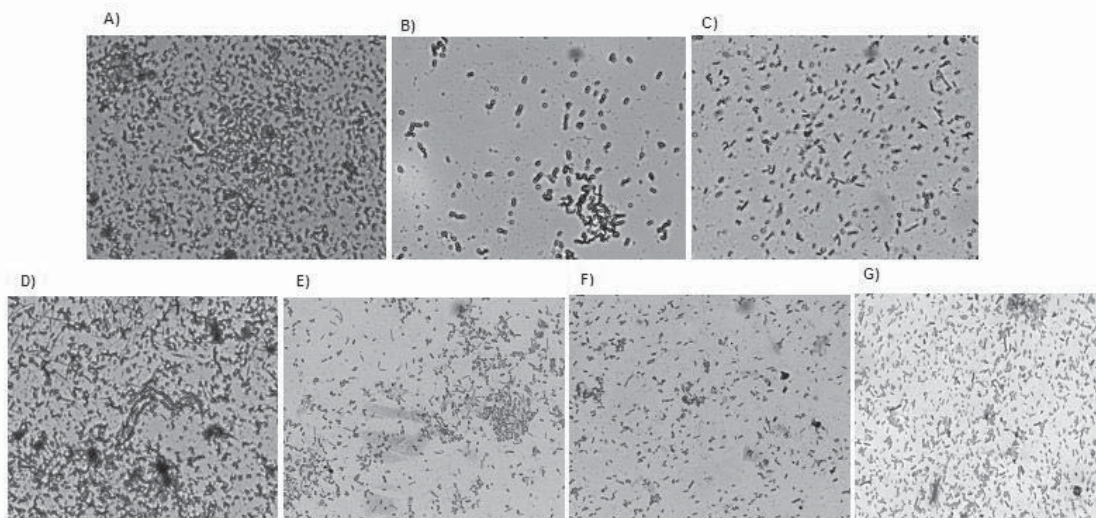


Figura 35. Aglutinación de bacterias por fracción proteica cetónica de Flor de Manita. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.247 $\mu\text{g/mL}$), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.94 $\mu\text{g/mL}$), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.705 $\mu\text{g/mL}$), D) *Enterobacter aerogenes* (1.053 $\mu\text{g/mL}$), E) *Listeria monocytogenes* (0.559 $\mu\text{g/mL}$), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.95 $\mu\text{g/mL}$), G) *Serratia marcescens* (1.249 $\mu\text{g/mL}$).

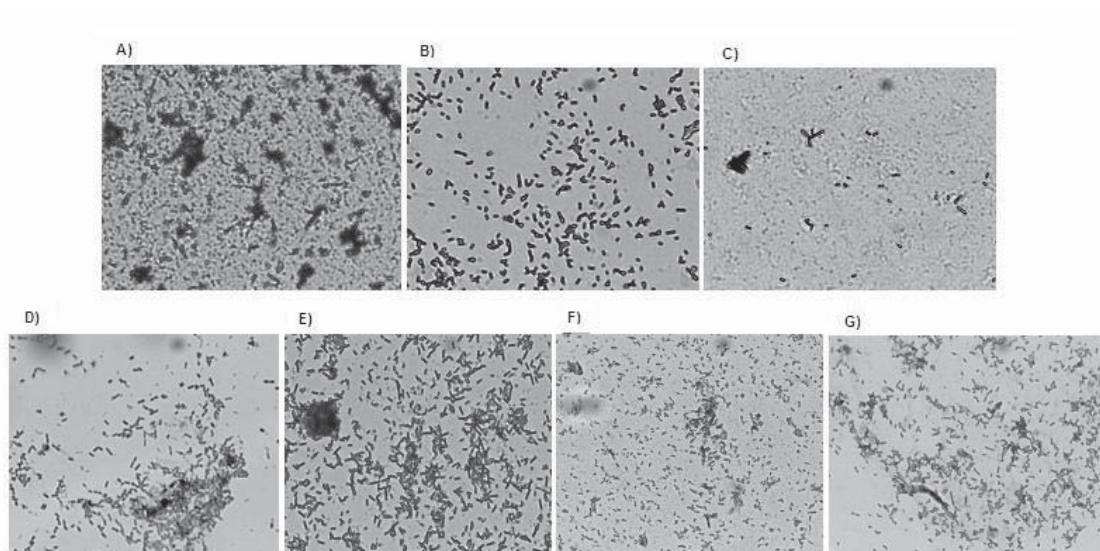


Figura 36. Aglutinación de bacterias por fracción proteica de Flor de Manita. Se muestran las micrografías (100X) de la aglutinación provocada con la mínima dosis. A) *Escherichia coli* ATCC 25922 (0.067 µg/mL), B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0.135 µg/mL), C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (0.38 µg/mL), D) *Enterobacter aerogenes* (0.068 µg/mL), E) *Listeria monocytogenes* (0.077 µg/mL), F) *Staphylococcus saprophyticus* (0.038 µg/mL), G) *Serratia marcescens* (0.578 µg/mL).

VIII DISCUSION

Este trabajo de tesis se enfocó en estudiar el efecto antibacteriano de plantas medicinales, comúnmente estudiadas en nuestro país. Hasta donde sabemos es el primer estudio a nivel mundial en el que se analizan diferentes fracciones que tienen las plantas y que pueden tener esta actividad antibacteriana.

Por esta razón lo primero que se analizó es si las plantas utilizadas presentaban actividad hemaglutinante, que indica la presencia de lectinas. Como se presentó en las Tablas 6, 8, 10, 12, 14 y en las Figuras 4, 11, 17, 23 y 30. Todas las plantas utilizadas en el presente estudio exhiben esta actividad. Es importante resaltar que con excepción de la Ruda que solamente presentó actividad con el tipo sanguíneo B, en todas se encontró que presentan actividad hemaglutinante con diferentes tipos sanguíneos lo que indica una mezcla de lectinas, sin embargo, la especificidad para diferentes carbohidratos varió entre las plantas. La identificación de lectinas es la primera en ser realizada para este tipo de plantas medicinales, ya que no existen datos previos en la literatura.

La jamaica reconoce a los cuatro grupos sanguíneos A₁, A₂ (GalNAc-Gal-Fuc), B (Gal-Gal-Fuc) y O (Fuc-Gal), (Martínez JR 2008). El extracto crudo y la fracción proteica de jamaica presentaron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM: 63 µg/mL) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM: 0.16 µg/mL). En el resto de las bacterias no se observó actividad. Esto se explica porque las lectinas de estas fracciones reconocen a los carbohidratos terminales de lipopolisacaridos que constituyen la pared. En el caso de *Escherichia coli* presenta en su superficie Neu5Acα3Galβ4-Glcβ Cer y también presenta lectinas (adhesinas) que reconocen Galβ3GalNAcβ4(NeuAcα 3)Gal β 4Glc β Cer . La lectina pura de jamaica (HSL) presento actividad solamente contra *S. aureus* a las 5 horas, posteriormente pierde su efecto, lo que probablemente se deba a que el resto de las proteínas le confieren estabilidad como en el caso de la fracción proteica. *Staphylococcus aureus* presenta en su superficie cadenas alternas de GlcNAc ó GalNAc-MurNAc (L-alanina-D-isoglutamina-L-lisina-D-alanina), así como también presenta lectinas

(adhesinas) que reconocen D-galactosa, ácido D-glucouronico y N-acetilglucosamina (Varki, 1999). De esta manera se explica la acción del extracto crudo de jamaica (halo de inhibición), ya que contiene lectinas que reconoce específicamente a carbohidratos terminales del peptidoglicano. La especificidad de las lectinas se demuestra ya que une a los carbohidratos terminales de estas dos bacterias y es igualmente efectiva con bacterias Gram negativas y Gram positivas. En el caso de los métodos de análisis de aglutinación y numero de bacterias., se confirmaron los resultados obtenidos con el método de Kirby-Bauer, los dos métodos nos permitieron estudiar esta actividad, el primer método utilizado exhibió una mayor sensibilidad (CIM) y con el segundo nos permitió analizar el numero de bacterias y que efecto se presentaba como es de lisis, aglutinación o sin efecto, en el que las bacterias se encontraban libres. La jamaica con sus fracciones estudiadas (EC, FP, HSL) aglutinaron a las diferentes bacterias, únicamente en concentraciones muy pequeñas ya que en las que se observó el efecto antibacteriano las bacterias se encontraban lisadas.

Es importante señalar que los pigmentos extraídos de la jamaica no tienen actividad como lo mostraron los ensayos de inhibición de crecimiento (cuantificación del halo), la cuantificación bacteriana con densitometría y el análisis de microscopía, donde las bacterias se encontraron de forma aislada. Esto constituye un aporte, ya que en la literatura se proponían que los flavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas, eran los compuestos activos que originaban la actividad antibacteriana (Chen, y col., 2004, Carvajal, O., y col., 2006).

La Gobernadora presentó actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*. Utilizando el método de Kirby-Bauer, no se observó efecto contra *P. aeruginosa*. Lo que se confirmó con el análisis con el número de bacterias. Sin embargo, utilizando este último método, encontramos que el extracto crudo y la fracción proteica inhiben principalmente a *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus saprophyticus*. Y en menor grado a *E. coli* y *S. aureus*. Es evidente que las lectinas presentes en esta planta exhiben una especificidad para carbohidratos diferente ya que *Staphylococcus saprophyticus* presenta Gal β 4GlcNAc en la capa de

peptidoglicano y para *Enterobacter aerogenes* que es una bacteria Gramnegativa presenta GlcNAc-GlcNAc-Glc-Ramnosa-Gal.

Por otro lado, los pigmentos presentes en la gobernadora (cuantificación del halo), no mostraron inhibición del crecimiento en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que este no es un método muy sensible no se puede observar a simple vista la mínima inhibición, en la cuantificación bacteriana (con densitometría) se observó inhibición de crecimiento por los pigmentos contra Gramnegativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, y para Grampositivas: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ya que disminuye significativamente el número de bacterias. Para *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterobacter aerogenes* no se observa inhibición por pigmentos, lo cuál nos indica que ésta se debe a la unión de las lectinas presentes en la gobernadora.

La Ruda presentó una alta especificidad en la actividad hemaglutinante ya que únicamente reconoce al tipo sanguíneo B (Gal-Gal-Fuc). La actividad antibacteriana con las cepas de referencia resultó ser positiva contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM: 13 µg/mL) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM: 17 µg/mL). Utilizando el método de cuantificación de bacterias se observó que ruda tiene un mayor efecto sobre *Listeria monocytogenes* ya que se observó la inhibición desde 5 hasta las 48 horas, mientras que para *Staphylococcus aureus* solo lo inhibe hasta las 24 horas, y finalmente para *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter aerogenes* se observa inhibición de crecimiento a solo hasta las 5 horas, después se presenta un incremento en la absorbancia, por tanto el numero de bacterias incrementa, por lo que se observa que se pierde el efecto inhibitorio, por otro lado, no se observa efecto inhibitorio en *P. aeruginosa* y *Staphylococcus saprophyticus* no se observa ningún efecto.

Los pigmentos presentes en la Ruda solo presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*, lo que probablemente se debe a la configuración de éstos carbohidratos en la superficie celular.

Los resultados del Neem mostraron que el extracto crudo y la fracción proteica también son efectivos contra las cepas de referencia *Escherichia coli*

ATCC 25922 (CIM: 35 µg/mL) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM: 20 µg/mL). Al realizar el ensayo con el resto de las bacterias se observó que el extracto crudo inhibe el crecimiento de *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens* y *Listeria monocytogenes* hasta las 48 horas y para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes* solo se observa inhibición a las 5 horas.

Cuando se analizó la actividad de una lectina purificada de las hojas del Neem se observó que presenta actividad antibacteriana solo con *Listeria monocytogenes* ya que solo en esta disminuye significativamente el número de bacterias y esta disminución se mantiene por 5 horas. Además se observó que esta actividad se mantiene hasta concentraciones de 0.048 µg/mL. La especificidad de la lectina se demuestra ya que une a los carbohidratos terminales de esta bacteria y al parecer solo es efectiva con Grampositivas. En cuanto al resto de las bacterias analizadas no se observó actividad ya que expresan diferentes carbohidratos ó su conformación es diferente (Varki, 1999).

Los pigmentos extraídos del Neem no tienen actividad como lo mostraron los ensayos de inhibición de crecimiento (cuantificación del halo). Pero esto debido a que este método no es muy exacto y no se puede observar una mínima inhibición, ya que al realizarlo por densitometría se observó que los pigmentos del Neem inhiben a *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Serratia marcescens*.

La Flor de Manita, mostró actividades antibacterianas contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM: 214 µg/mL) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM: 7 µg/mL). Como se puede observar la concentración mínima inhibitoria es significativamente menor en el caso de *S. aureus*, lo que indica una mayor afinidad, lo que se puede deber a que en su superficie cadenas alternas de GlcNAc-MurNAc(L-alanina-D-isoglutamina-L-lisina-D-alanina), así como también presenta lectinas (adhesinas) que reconocen D-galactosa, ácido D-glucourónico y N-acetilglucosamina. De esta manera se explica la acción del extracto crudo de flor de manita (halo de inhibición), ya que contiene lectinas que reconoce específicamente a carbohidratos terminales del peptidoglicano.

Por otro lado, la fracción proteica, que se encuentra enriquecida, con mayor cantidad de proteínas. Los resultados encontrados mostraron que no existe diferencia al ser comparados con el extracto crudo para *Escherichia coli*, mientras que para *Staphylococcus aureus* no se observa inhibición debido a la configuración de los carbohidratos terminales, y para *Pseudomonas aeruginosa* si se observó inhibición de crecimiento. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* presenta en su superficie GlcNAc- GlcNAc-Glu-Ramnosa-Gal, así como también presenta lectinas (adhesinas) que reconocen D-galactosa, D-manosa, GalNAc β 4Gal (Varki, 1999).

Los pigmentos presentes en flor de manita presentan actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ya que disminuye significativamente el número de bacterias, mientras que para *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Serratia marcescens*, no se observa inhibición esto debido a la configuración de los carbohidratos terminales presentes en la superficie celular. Lo que indica que los pigmentos y otros compuestos fenólicos presentes en la flor de manita presentan actividades biológicas y este resultado es congruente con datos reportados por Alanís en 2005.

Este constituye el primer trabajo que correlaciona la actividad antibacteriana con las lectinas, lo que plantea un campo de trabajo en el que se pueden desarrollar muchos estudios enfocados a comprender el mecanismo de acción involucrado.

IX CONCLUSIONES

- Se comprobó la actividad hemaglutinante en los 5 extractos crudos: Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), Gobernadora (*Larrea tridentata*), Neem (*Azadirachta indica*), Ruda (*Ruta graveolens*), Flor de Manita (*Chirantrodendron pentadactylon*).
- El extracto crudo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), Neem (*Azadirachta indica*), Flor de Manita (*Chirantrodendron pentadactylon*), presenta actividad hemaglutinante con los grupos sanguíneos A₁ y A₂: GalNAc-Gal-Fuc, B: Gal-Gal-Fuc y O: Fuc-Gal.
- El extracto crudo de Ruda (*Ruta graveolens*), solo presenta actividad hemaglutinante con el grupo sanguíneo B: Gal-Gal-Fuc.
- El extracto crudo de la Gobernadora (*Larrea tridentata*), solo presenta actividad con los grupos sanguíneos B: Gal-Gal-Fuc, y O: Fuc-Gal.
- Las lectinas presentes en la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, presentando un tiempo de efecto de hasta 5 horas.
- La Fracción Proteica de la Gobernadora (*Larrea tridentata*) inhiben el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterobacter aerogenes*, y comprobado que la inhibición no es causada por los pigmentos.
- La Fracción Proteica de la Ruda (*Ruta graveolens*) inhiben el crecimiento de *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Listeria monocitogenes*, y comprobando que para estas bacterias el efecto inhibitorio no es causado por los pigmentos.

- La Fracción Proteica del Neem (*Azadirachta indica*), solo inhiben el crecimiento de *Listeria monocitogenes*, presentando un tiempo de efecto de hasta 5 horas, y comprobando que el efecto inhibitorio no se debe a los pigmentos.
- La Fracción Proteica de la Flor de Manita (*Chirantrodendron pentadactylon*) solo inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* , comprobando que los pigmentos no provocan este efecto inhibitorio..
- El presente trabajo es el primer estudio donde se correlaciona la actividad hemaglutinante (presencia de lectinas) y la actividad antibacteriana en plantas medicinales Mexicanas.

X BIBLIOGRAFIA

- Ajay, M; Chai, H.J.; Mustafa, A.M.; Gilani, A.H., Mustafa, M.R; Mechanisms of the Anti-Hypertensive effect of *Hibiscus Sabdariffa* L. Calyces. Journal of Ethnopharmacology, 2007, Vol. 109, Pág. 388-393.
- Alanís, A.D.; Calzada, F.; Cervantes, J.A.; Torres, J.; Ceballos, G.M.; Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders, [Journal of Ethnopharmacology](#), 2005, Vol. 100, Pág 153-157.
- Alarcón, A. F.; Zamilpan, A.; Perez, M.D.; Almanza, P,J,C.; *Hibiscus sabdariffa* on Obesity in MSG mice, Journal Ethnopharmacology, 2007, Vol. 114 Pág 66-71.
- Ali-Shyayeh, M.; Yaghmour, R.; Faidi, Y.; Salem, K. and Al-Nuri, M.; Antimicrobial Activity of 20 Plants used in Folkloric Medicine in the Palestinian Area, J. of Etnopharmacol, 1998, Vol. 60, Pág. 265-271.
- Alvarez, M. E., Isaza, G., Echeverri, M., efecto antibacteriano *in vitro* de *Austroeupatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna), Biosalud, 2005, Vol. 14, Pág. 46-55
- Anderson, E.; Barthlott, W.; Brown, R.; The cactus family, Timber Press. 2001, Pág. 55, 70, 645,646.
- Annuk, H., Sean, O. H., Hirno, S., Mikelsaar, M., Wadstram, T., Characterisation and differentiation of lactobacilli by lectin typing, J. Med. Microbiol, 2001, Vol 50, Pág 1069-1074.
- Avellaneda, S.; Rojas, N.; Cuellar, A.; Fonseca, R.; Actividad antibacteriana de *Diphyssa minutifolia* Rose. rev cubana plant med. 2005, Vol. 10, Pág. 2
- Badreldin, H., Ali, Naser, A, W., Gerald, B.; Phytochemical, pharmacological and toxicological aspect of *Hibiscus sabdariffa* L. Phytotherapy Research, Issue 5, 2005, Vol. 19, Pág. 369-375.
- Bahr, R.F.; Plantas medicinales.Virtudes insospechadas de plantas conocidas. Selecciones Readers Digest. Mexico, D.F., Nueva Cork, 1988, Pág 5-23, 63-87.
- Bailey y Scout; Diagnostico microbiológico, Editorial Medica Panamericana; 11° edición, 2004; Pág. 236.
- Bernard D, Davis.; Tratado de Microbiología, Segunda edición, Edit. Salvat, editores. 1993, Pág. 1151.
- Bohinski, Robert C.; Bioquímica, Capitulo10, Quinta edición, Addison-wesley. Iberoamericana, 1991, Pág. 411.
- Brooks, G., Batel, J., Morse, S., Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg, Edit. Moderno, 2005, edición 18°, Pág 9-39.
- Carvajal, O.; Waliszewski, S.; Infanzón, R. M.; Los usos y maravillas de la jamaica, Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. 2006, Vol. 19.
- Cona. E.; Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar, Rev Chil Infect, 2002, Vol. 19, Pág. 77-81.

- Conrick J.; Neem, the Miraculous Healing Herb. The Neem Association, 2003, Pág 1-21.
- Córdoba, E., Presencia de lectinas en *Eichornia crassipes* y *Lemna minor* reservorios de *Vibrio cholerae*, 2000, Pág 18-21.
- Correll, D. S.; Johnston, M. C.; Manual of the vascular plants of Texas, Texas Research Foundation, Renner, Texas, 1970
- Cruz, P.; Pérez Campos, E.; Martínez Martínez, Lucía.; Ortiz, B.; Martínez, G.; Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones prot-carbohidrato REB, 2005, Vol. 24 (1) Pág. 21-27
- De Los Ríos, C.; Hidalgo, D.; Quintero, M.; Márques, G.; Crescente, O.; Estudio preliminar *in vitro* de la actividad biológica de *Chromolaena voglii*, Rev. de la Facultad de Farmacia, 1999, Vol. 36, Pág 22-25.
- Duke, J. A.; Handbook of medicinal herbs; CRC Press, Inc.; Boca Raton, Fla; 1985.
- El-Merzabani, M.M., El-Aaser A.A.; Attia M.A; El-Duweini A.K.; Ghazal A.M.; 1979, Screening system for Egyptian plant with potencial anti-tumors activity, Planta Med, Vol. 36, Pág 150-155.
- Hart, A.; Lectins in biological systems: applications to microbiology 1^o2, Am.J Clin. Nutr, 1980, Vol 33, Pág. 2416-2425.
- Hernández, C., Pérez, C, E; Martines, M, L; Ortiz, B; Martines, G.; las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. 2005, REB, Vol. 24 (1), Pág. 21-27.
- Jaramillo, T.; Antonio C.; MD.; Adhesinas y otras lectinas microbianas que tienen que ver con la virulencia, la difusión endotelial y epitelial, 2002.
- Koneman, Elmer W.; Diagnostico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana, Edición 5, 2000, Pág. 795-798
- Liu, Humberto.; Lengua, L. Alberto.; León, M. G.; La Torre, Carla.; Huapaya, Y.; Chauca, J.; Evaluación de la Actividad Antibacteriana *in vitro* de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto", 2002, Vol. 2.
- Lock de Ugaz, O.; Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales., Fondo Editorial; 1988, Pág. 211.
- Maguna, P.; Romero, A.; Garro, O.; Okulik, N.; Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides, Facultad de Agroindustrias, UNNE, 2006.
- Martínez, M.; Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 1979.
- Mier, E.J.; Rivas, C.; Oranday, A.; Silva, S. Y.; Garza, E.; Leos, M.; actividad antimicrobiana de los extractos de *Eysenhardtia polystachya texana*, Facultad de Ciencias Biológicas y Facultad de Medicina de la UANL, 2006.
- Morales, M.E.; Verde, J.; Oranday, A.; Rivas, C.; Arévalo, K.; Treviño, J.F.; Carranza, P.; Cruz, D.E.; Actividad biológica de *Iophocereus schottii* (engelm) britton and rose, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León y Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS, 2007.
- Omobuwajo, T, O.; Sanni, L, A.; Balami. Y, A.; Physical properties of (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Seeds. Journal of Food Engineering, 2000, Vol. 45, Pág. 37-41.

- Pérez, F. M.; Santoyo, F.; Empleo de cicloadiciones 1,3-dipolares y Adiciones tipo Michael Con nuevas metodologías para la síntesis de neoglicoconjugados multivalentes. Estudio de afinidad con lectinas, Edit. de la universidad de granada, 2005, Pág. 1-364.
- Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P. G.; Toso, S.; Antioxidant Power Quantificación of Decoction and Cold Infusions of *Hibiscus Sabdariffa* Flower. Food chemistry, 2005, Vol. 100, Pág. 433-438.
- Rangel, D.; Garcia, I.; Velasco, J.; Buitrago, D.; Velazco, E.; Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers, revista de la facultad de farmacia, 2001, Vol. 42, Pág. 43
- Readers Digest, Medicina de la naturaleza. Selecciones Readers Digest. Buenos Aires, Madrid, México, 2007, Nueva Cork Vol. 5, Pág. 11-116.
- Romero, R.; Microbiología y Parasitología Humana, Edit. Panamericana, 2007, edición 3°, Pág. 623-637.
- Salama, R.B.; Ergosterol in Hibiscus sabdariffa seed oil. Planta Med, 1979, Vol. 36, Pág. 221-223.
- Sanabria, A.; Mendoza, A.; Moreno, A.; Actividad microbiana *in vitro* de angiospermas Colombianas, Rev. Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 1998, Vol. 27, Pág. 47-51.
- Sanabria, A.; Biodiversidad, Tradiciones e investigación al servicio de la salud, 2003, Pág 22-31.
- Sharon, N.; Lis, H.; Lectins Encyclopedia of live Sciences. 2001. Pág. 1-7
- Sharon, N.; Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals an atomic view. Trends Biochem Sci., 1993, Vol. 18, Pág. 221-226
- Sharon y Lis, 1989
- Sharon, N., Lis, H; History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, 2004, Vol. 14, Pág. 53-62.
- Shultz, E.B.; Bhatnagar, D.; Jacobson, M.; Metcalf, R.L.; Saxena, R.C.; Unander, D.; Vietmeyer, N.D.; Neem: A Tree For Solving Global Problems. 1992. The National Academy Press. Pág. 1-152.
- Silva, J; Martins A; Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefoliu*. Rev Cubana Plant Med, 2000, Vol. 5, Pág. 26-29.
- Stryer, L.; Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Bioquímica. 5ta ed. Reverte. Barcelona, 2003, Pág. 312-318
- Thakurta, P.; Bhowmik, P.; Mukherjee, S.; Hajra, TK.; Patra, A.; Bag, PK.; Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. Journal of Ethnopharmacology, 2007, Vol. 111, Pag. 607-612.
- Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J.; (Eds). Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, Chapter 21. Plant Lectins, Pág.321-330.
- Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J.; (Eds). Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, Chapter 28. Plant Lectins, Pág. 429-438.
- Villaseñor Ríos, J. L.; y F. J. Espinosa García, Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo

Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 1998.

- Went, T, W.; Las plantas. Colección de la naturaleza de time life. 2da ed. Ediciones culturales internacionales, 2001, Ámsterdam, Pág. 9-12.
- <http://www.iqfr.csic.es>
- http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee072007/documentos/trabajos_libres/59_morales_-rubio_y_col..pdf
- <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-14-2006/documentos/Art76.pdf>
- http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art7_Vol2_N1-2.pdf -
- <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>
- <http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>.
- <http://www.who.int/es/>
- www.monografias.com/trabajos11/lecti/lecti.shtml
- <http://www.uv.mx>; Omobuwajo, et al., 2000
- <http://es.wikipedia.org>
- <http://www.uv.mx>
- http://es.wikipedia.org/wiki/Hibiscus_sabdariffa
- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>
- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>
- http://www.mexicoforestal.gob.mx/nuestros_arboles.php?id=76
- http://es.wikipedia.org/wiki/Ruta_graveolens;
- <http://www.botanical-online.com/alcaloidesruda.htm>
- <http://www.zonaverde.net/rutagraveolens.htm>
- http://es.wikipedia.org/wiki/Azadirachta_indica
- <http://www.neem.es/>
- <http://www.liberaddictus.org/Pdf/0485-42.pdf>.