



**UNIVERSIDAD MICHOCANA  
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

---

**FACULTAD DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGIA**

**ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ANTI-DIARREICA *In Vivo* DE  
EXTRACTOS DE HOJAS DEL ARBOL FLOR DE MANITA  
(*Chiranthodendron pentadactylon*)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA  
p.QFB. CLAUDIA CECILIA ZAVALA SILVA**

**DIRECTORA DE TESIS  
D.C. BERTHA FENTON NAVARRO**

**MORELIA, MICHOCAN, MEXICO.  
MAYO, 2013**



El presente trabajo se desarrolló 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

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la vida, por la oportunidad de culminar un sueño más y acompañarme en cada instante de este sueño.

A mis padres **Olivia Silva y Rafael Zavala**; porque a ellos debo ser la persona que soy y porque de ellos es el mérito de poder terminar mi licenciatura, gracias por su esfuerzo diario y por su enorme sacrificio para verme convertida en una profesionista.

A mis hermanos **Leobardo y Magdalena**, porque sin su alegría y apoyo no hubiera podido tomar fuerzas para lograr lo que hoy hemos logrado.

A la **D.C. Bertha Fenton Navarro**, por dirigir este proyecto, por su gran paciencia, por sus conocimientos compartidos, por su tiempo invertido, por creer en mí, y hacer que de mi inexperiencia resultara una lección de vida y por ser parte importante para alcanzar esta meta.

A la **QFB. Erika Jazmín Martínez González**, gracias por su apoyo, su ayuda, su esfuerzo, sus ánimos, su compañía, gracias por hacer que cada día de trabajo haya valido la pena. A **Ivonne, Cleo y Juan Carlos** por que además de ser colegas y compañeros, son amigos y han sido para mí, un gran apoyo.

A mis revisores de tesis gracias por su tiempo invertido, por su ayuda, por su apoyo incondicional, gracias, porque hemos logrado hacer un proyecto de calidad. A todos ustedes por su apoyo y su paciencia.

**GRACIAS!!!!!!**

Con cariño

**Claudia Cecilia Zavala Silva**

INDICE GENERAL  
CONTENIDO

	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	i
<b>INDICE DE TABLAS</b>	v
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>GLOSARIO</b>	xv
<b>RESUMEN</b>	1
<b>I.- INTRODUCCION</b>	
<b>1.- Plantas medicinales</b>	2
1.1.- Medicina Tradicional	3
<b>2.- Árbol de Flor de manita (<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>)</b>	4
2.1.- Descripción	4
2.2.- Usos del árbol flor de manita en la medicina tradicional.	7
2.3.- Propiedades Farmacológicas del árbol Flor de Manita	9
2.3.1.- Acción Anti-colinérgica	9
2.3.2.- Actividad Anti-espasmódica	9
2.3.3.- Actividad Diurética	9
2.3.4.- Actividad Anti-inflamatoria	9
2.3.5.- Actividad Analgésica	10
2.3.6.- Actividad Anti-protozoarias	10
2.3.7.- Actividad Anti-bacteriana	10
2.3.8.- Actividad Vasoactiva	11
2.3.9.- Actividad Anti-diarreica	11
2.4.- Toxicidad de la Flor de manita	11
2.5.- Componentes activos y actividades biológicas relacionadas	12

<b>3.- Plantas y Farmacodinamia</b>	16
3.1.- Fitoterapia	16
3.2.- Fármacos	19
<b>4.- Clasificación de bacterias</b>	20
4.1.- Bacterias Gram positivas	21
4.2.- Bacterias Gram negativas	21
4.3.- Generalidades de la diarrea infecciosa	23
4.4.- Enterobacterias	25
4.5.- Enfermedades gastrointestinales en México	26
4.6.- Relación de bacterias con disentería	27
<b>5.- Actividad antimicrobiana</b>	27
5.1.- Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	28
5.2.- Evaluación <i>in vitro</i>	28
5.3.- Evaluación <i>in vivo</i>	29
5.4.- Farmacología de los procesos diarreicos	31
<b>II.- JUSTIFICACION</b>	35
<b>III.- HIPOTESIS</b>	35
<b>IV.- OBJETIVO GENERAL</b>	35
<b>V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	36
<b>VI.- MATERIAL</b>	36
<b>VII.- METODOS</b>	36
Obtención de Extracto Crudo (EC)	36
Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos	36
Obtención de la Fracción sin Pigmentos (FSP)	37
Cuantificación de Proteínas	37
Método de Extracción de Lípidos	38
Diálisis	38
Liofilización	39

Preparación de medios de cultivo	39
Estandarización del antibiótico	39
Escala de McFarland	40
Actividad Antimicrobiana (difusión en disco)	40
Determinación de la actividad anti-diarreica	41
Determinación de la inhibición de la motilidad intestinal	42
Análisis Estadístico	43
<b>VIII.- RESULTADOS</b>	44
<b>IX.- DISCUSION</b>	103
<b>X.- CONCLUSIONES</b>	111
<b>XI.- PERSPECTIVAS</b>	112
<b>XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	113

**INDICE DE TABLAS**

	<b>Página</b>
Tabla 1.- Flavonoides con actividad anti bacteriana	15
Tabla 2.- Características de las bacterias Gram positivas y Gram negativas	22
Tabla 3.- Valor CIM de EC dilución 1:4 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	45
Tabla 4.- Valor CIM de EC contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	46
Tabla 5.- Valor CIM de EC dilución 1:8 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	47
Tabla 6.- Valor CIM de EC contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	48
Tabla 7.- Valor CIM de EC dilución 1 :1 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	49
Tabla 8.- Valor CIM de EC dilución 1:2 contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	50
Tabla 9.- Valor CIM del EC F1 dilución 1:4 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	51
Tabla 10.- Valor CIM del EC F1 dilución 1:1 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	52
Tabla 11.- Valor CIM de EC F1 dilución 1:1 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	53
Tabla 12.- Valor CIM de EC F1 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	54
Tabla 13.- Valor CIM de EC F1 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	55
Tabla 14.- Valor CIM de EC F1 dilución 1:1 contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	56
Tabla 15.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	58
Tabla 16.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	59
Tabla 17.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	60

Tabla 18.- Valor CIM de EC F2 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	61
Tabla 19.- Valor CIM de EC F2 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	62
Tabla 20.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	63
Tabla 21.- Valor CIM de la FSP dilución 1:8 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	64
Tabla 22.- Valor CIM de la FSP dilución 1:1 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	65
Tabla 23.- Valor CIM de la FSP contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	66
Tabla 24.- Valor CIM de la FSP contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	67
Tabla 25.- Valor CIM de la FSP contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	68
Tabla 26.- Valor CIM de la FSP dilución 1:8 contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	69
Tabla 27.- Valor CIM de la FSP F1 dilución 1:4 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	70
Tabla 28.- Valor CIM de la FSP F1 dilución 1:1 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	71
Tabla 29.- Valor CIM de la FSP F1 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	72
Tabla 30.- Valor CIM de la FSP F1 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	73
Tabla 31.- Valor CIM de la FSP F1 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	74
Tabla 32.- Valor CIM de la FSP F1 contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	75
Tabla 33.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:8 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	76
Tabla 34.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:8 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	77

Tabla 35.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:1 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	78
Tabla 36.- Valor CIM de la FSP F2 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	79
Tabla 37.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1 :8 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	80
Tabla 38.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:8 contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	81
Tabla 39.- Valor CIM de PA dilución 1:4 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	83
Tabla 40.- Valor CIM de PA dilución 1:8 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	84
Tabla 41.- Valor CIM de PA dilución 1:1 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	85
Tabla 42.- Valor CIM de PA dilución contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	86
Tabla 43.- Valor CIM de PA dilución 1 :1 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	87
Tabla 44.- Valor CIM de PA contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	88
Tabla 45.- Valor CIM de PE contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	89
Tabla 46.- Valor CIM de PE contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	90
Tabla 47.- Valor CIM de PE contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	91
Tabla 48.- Valor CIM de PE contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	92
Tabla 49.- Valor CIM de PE contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	93
Tabla 50.- Valor CIM de PE contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	94
Tabla 51.- Comparación de CIM entre extractos de hojas del árbol flor de manita ( <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> )	95
Tabla 52.- Actividad anti-diarreica de los extractos de las hojas del árbol flor de manita ( <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> )	96
Tabla 53.- Numero y consistencia de heces.	99

Tabla 54.- Inicio de diarrea (hr) en los grupos tratados con controles y extractos de hojas de flor de manita.	100
Tabla 55.- Efecto de los extractos de las hojas flor de manita en diarrea inducida con aceite de ricino	101
Tabla 56.- Motilidad intestinal de los extractos de las hojas del árbol flor de manita	102

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 1.- Árbol Flor de manita ( <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> )	5
Figura 2.- Flor del árbol flor de manita ( <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> )	6
Figura 3.- Hojas del árbol flor de manita ( <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> )	6
Figura 4.- Fruto del árbol flor de manita ( <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> )	7
Figura 5.- Pared de las bacterias gram positivas.	21
Figura 6.- Pared de las bacterias gram negativas	22
Figura 7.- Distribución porcentual de población de 0 a 4 años	24
Figura 8.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	44
Figura 9.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	45
Figura 10.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	46
Figura 11.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	47
Figura 12.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	48
Figura 13.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	49
Figura 14.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	51
Figura 15.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	52
Figura 16.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	53
Figura 17.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	54

Figura 18.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	55
Figura 19.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	56
Figura 20.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	57
Figura 21.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	58
Figura 22.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	59
Figura 23.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	60
Figura 24.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	61
Figura 25.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	62
Figura 26.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	63
Figura 27.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	64
Figura 28.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	65
Figura 29.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	66
Figura 30.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	67
Figura 31.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	68
Figura 32.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	69

Figura 33.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	70
Figura 34.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	71
Figura 35.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	72
Figura 36.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	73
Figura 37.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	74
Figura 38.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	76
Figura 39.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	77
Figura 40.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	78
Figura 41.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	79
Figura 42.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	80
Figura 43.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	81
Figura 44.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	82
Figura 45.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	83
Figura 46.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	84
Figura 47.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	85

Figura 48.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	86
Figura 49.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	87
Figura 50.- Antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	89
Figura 51.- Antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	90
Figura 52.- Antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	91
Figura 53.- Antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	92
Figura 54.- Antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	93
Figura 55.- Actividad antibacteriana <i>in-vitro</i> de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	94
Figura 56.- Protección (%) contra la diarrea de los extractos de hojas del árbol flor de manita	97
Figura 57.- Efecto de extractos de hojas de flor de manita en diarrea inducida con aceite de ricino en ratas	98
Figura 58.- Evaluación de motilidad en intestino delgado	102

**LISTA DE ABREVIATURAS**

%	Por ciento
° C	Grados centígrados
α	Alfa
β	Beta
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Concentración
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CN	Control Negativo
CP	Control Positivo
DE	Desviación Estándar
EC	Extracto Crudo
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> anteroagregativa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura
FSP	Fracción sin Pigmentos
F1	Fracción Orgánica
F2	Fracción Proteica
Gal	Galactosa
GalNAc	N-AcetilGalactosamina
Glc	Glucosa
gr	gramos
hrs	Horas

mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NeuAc	Ácido N-Acetilneuramínico
nm	Nanómetros
Kg	Kilogramo
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
spp	Especies
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
µg	Microgramos
µL	Microlitros
PA	Pigmentos Acetónicos
PBS	Buffer Fosfato Salino
OCDE	Organización de Cooperación y Desarrollo Económico
PE	Pigmentos Etanólicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
TMP	Trimetropim
SMX	Sulfametoxazol

## GLOSARIO

**Anti diarreico:** Fármaco u otro tipo de agente que disminuye los síntomas de diarrea. Los anti diarreicos actúan absorbiendo agua del tubo digestivo, alterando la motilidad intestinal, modificando el transporte de electrólitos o bien mediante la adsorción de toxinas o de microorganismos.

**Colelitiasis:** comúnmente conocida como cálculos biliares o litiasis biliar.

**Dispepsia:** Es un trastorno del aparato digestivo; éste se vuelve difícil y doloroso. Comúnmente la dispepsia se denomina como mala digestión.

**Glabrescentes:** Casi desprovisto de pelos.

**Íleo paralítico:** El íleo es la parálisis del tránsito intestinal. El íleo paralítico se presenta en el periodo postoperatorio inmediato de las cirugías intestinales, infecciones intraabdominales, por alteraciones químicas, electrolíticas o minerales.

**In-vitro:** procesos biológicos o experimentos que se desarrollan en un ambiente artificial, fuera de un organismo o cuerpo.

**In-vivo:** procesos biológicos o experimentos que se desarrollan en un organismo vivo o cuerpo.

**Perítrico:** Rodeado de pelos, se aplica sobre todo a las bacterias provistas de flagelos.

**Pletismografía:** Técnica de diagnóstico que mide las variaciones del volumen del flujo sanguíneo, que pasa a través de una extremidad o parte de ella, en reposo y en ejercicio, su uso está más extendido en el diagnóstico de oclusiones venosas. Hay varios tipos de pletismografía; digital, segmentaria, impedancia

## RESUMEN

La flor de la manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) recibe un uso frecuente para curar malestares del corazón en regiones del centro y sur de México. En el estado de Michoacán la flor se hierve con floricuerno, damiana californica, pasiflorina y flores de azahar, de esta infusión se bebe una taza en la mañana y otra en la noche, con el fin de “calmar los nervios”. Hasta el momento las hojas del árbol de flor de manita solo existen reportes farmacológicos sobre su acción diurética, analgésico. Sorprendentemente no existen reportes acerca de su actividad anti-diarreica, por lo que en este trabajo se reporta por primera vez la acción anti bacteriana *in-vitro*, la actividad anti-diarreica *in-vivo* y la evaluación de la motilidad intestinal de las hojas del árbol flor de manita.

La actividad anti bacteriana *in-vitro* de los extractos de las hojas del árbol flor de manita se realizó mediante ensayos de difusión en disco, obteniéndose como resultado actividad contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por parte del EC (CIM: 0.04 mg/mL); el EC F1 mostró mayor actividad *Escherichia coli* ATCC 27543 (CIM: 0.034 mg/mL), el EC F2 contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM: 0.09 mg/mL); la FSP mostró mayor actividad contra *Escherichia coli* ATCC 27543 (CIM:0.039 mg/mL), la FSP F1 contra *Escherichia coli* ATCC 27543 (CIM: 0.025 mg/mL), la FSP F2 mostró mayor actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM: 0.040 mg/mL); los PA contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM: 0.125 mg/mL). La actividad anti-diarreica inducida con aceite de ricino, arrojó los siguientes resultados: Control positivo (loperamida): 92.59%, control negativo (Sol. Salina): 0%, EC: 56.8%, FSP: 43.2%, PA: 83.95%, PE: 35.8%. Los resultados corroboran el uso de la medicina tradicional de las hojas del árbol flor de manita para el tratamiento contra la diarrea. Al ser un problema de salud pública, representa una alternativa para controlar esta enfermedad, que es de las más frecuentes en nuestro país y más aun en nuestro estado.

**Palabras Clave:** Flor de manita, *Chiranthodendron pentadactylon*, actividad anti-diarreica, actividad antibacteriana.

## **I.- INTRODUCCION**

### **1.- PLANTAS MEDICINALES**

Una planta medicinal es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser usadas terapéuticamente o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica (Morales y col., 2009). Las plantas medicinales elaboran principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, benéfica o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad (Muñoz, 2002).

Las plantas medicinales son el mayor recurso terapéutico usado por las medicinas tradicionales de muchos países y la OMS apoya la incorporación de estos recursos en la atención primaria de la salud. La FAO sostiene que los conocimientos de los pobladores indígenas han contribuido al descubrimiento de alrededor de las tres cuartas partes de los medicamentos de origen vegetal que se emplean ampliamente en el mundo desarrollado (Villar y col., 2000).

La medicación basada en el empleo de las plantas reconocidas tradicionalmente como eficaces para el tratamiento de numerosas y variadas enfermedades resulta en contraste, por su cautelosa administración y dosificación, también tradicionalmente conservadas de manera empírica, resulta generalmente inocua, no iatrogénica. De aquí deriva que muchas personas acudan a la medicación herbolaria, alrededor del 60% de la población mundial permanece dependiente a la medicina tradicional para su cuidado (Viji y col., 2010). Aunque naturalmente carecemos de las correspondientes noticias, ya que no existen documentos al respecto, podemos aceptar que, desde la más remota antigüedad, quizá desde tiempos prehistóricos tempranos, comenzó el hombre a reconocer y diferenciar las calidades de las plantas (Lozoya, 1976).

### 1.1.- Medicina Tradicional

La práctica de la medicina, de acuerdo a diferentes tradiciones y en diversas sociedades, es un arte que utiliza un enorme cuerpo de conocimientos especializados para dominar la enfermedad y mantener la salud. El término que se considera más útil para distinguir esta clase de práctica médica, es el de “medicina tradicional” acuñado a principios de 1970 junto con otros términos tales como “medicinas paralelas”, etc. Para los países en desarrollo como México, el estudio de la medicina tradicional vino a constituirse en una alternativa para su búsqueda de la salud (Ramírez, 1978).

La OMS define a la medicina tradicional como “la suma de todos los conocimientos teóricos y prácticos, explicables o no, utilizados para diagnóstico, prevención y supresión de trastornos físicos, mentales y sociales, basados exclusivamente en la experiencia y la observación, y transmitidos verbalmente o por escritos de una generación a otra” (Landiva y col., 2004).

La medicina tradicional emplea los recursos de la naturaleza para mantener y restaurar la salud. Constituye una terapéutica racional que estudia individualmente las causas de la enfermedad, aplicando los métodos que la experiencia ha fundamentado, por la eficacia obtenida. En México las creencias y prácticas distintivas acerca de la medicina caracterizan a los grupos étnicos sobrevivientes tales como nahuas, mayas, totonacos, mixes, etc.; que conservan las artes médicas impregnadas de profundas raíces históricas (Ramírez, 1978). En épocas remotas la medicina tradicional había alcanzado un alto nivel; luego cayó en una especie de abandono, por el desconocimiento de su aplicación concreta, hasta que, actualmente, se ha vuelto a reivindicar (Lifchitz, 2006).

En las últimas décadas ha aumentado considerablemente el uso de productos naturales como agentes terapéuticos; esto se debe a que se considera que regresar a lo natural es la mejor manera de llevar una vida más saludable. Cerca del 25% de los medicamentos prescritos a nivel mundial provienen de plantas; de éstos, 121 compuestos activos son considerados de uso diario.

De las 252 medicinas consideradas como básicas y esenciales por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 11% son exclusivamente de origen de plantas y un gran número de los medicamentos sintéticos es obtenido de precursores naturales. Además se estima que el 60% de los medicamentos antitumorales y anti infecciosos son de origen natural. Para cubrir la necesidad de encontrar nuevos medicamentos de fuentes naturales, los investigadores se han dado a la tarea de buscar nuevas estrategias de obtención de los mismos. La estrategia común es la observación cuidadosa del uso de dichas fuentes en la medicina popular de diferentes culturas. No es coincidencia que los productos naturales hayan jugado y siguen teniendo un papel fundamental en el descubrimiento y desarrollo de agentes farmacéuticos; tres billones de de evolución biológica ha dado como resultado el desarrollo de vías metabólicas que llevan a cabo la síntesis de agentes anti-bacterianos, anti-fúngicos, anti-protozoos y anti-insectos (<http://cdigital.dgb.uanl.mx>).

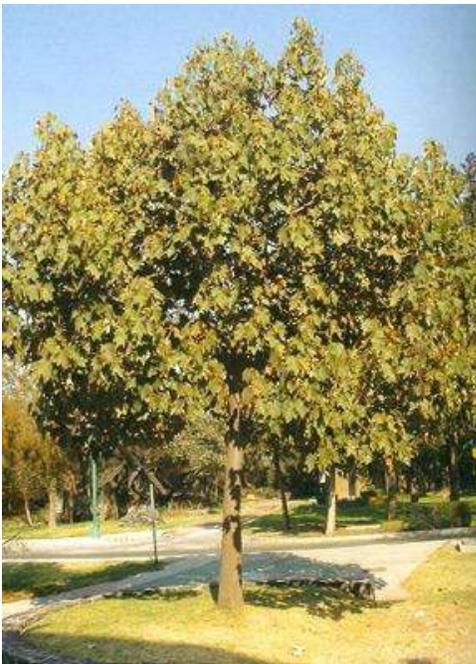
## **2.- ARBOL DE FLOR DE MANITA (*Chiranthodendron pentadactylon*)**

**2.1.- Descripción:** En los bosques mesófilos de montaña, en los mixtos de pino y encino y en bosques con climas templados de los estados de Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Morelos, Michoacán y en Guatemala, crece un frondoso árbol, de tronco ancho y gran altura, que produce una flor leñosa de color rojo intenso en forma de mano (<http://www.biodiversidad.gob.mx>).

El árbol alcanza 10 m (Fig.1) de altura aunque hay individuos que miden hasta 30m; su madera es frágil. La corteza del tronco es lisa y de color café; las ramas especialmente cerca de las hojas, están revestidas de un tomento compuesto de pelos estrellados que, en conjunto, presentan un color ferrugíneo.

Las hojas son simples, alternas, anchamente ovadas, 3 a 7-lobuladas, glabrescentes en la cara superior, vellosa ferrugínea en la cara inferior, con pecíolo de 8 a 11 cm, y están provistas de pequeñas estípulas lanceoladas y caducas que miden 1 cm de largo (Fig.3). Flores bisexuales, zigomorfas, solitarias, sin corola; cáliz sin sépalo, campanulado, profundamente 5-lobulado, de color verde, rojizo o rojo, de 3.5 a 4.5 cm de largo; estambres 5, unidos en una columna

y hacia fuera se extienden dando un aspecto semejante a los dedos de una mano, de color rojo; estilo exerto (estambres que sobresalen de la flor) de la columna de los estambres, ovario súpero (Fig.2). Frutos cápsulas de 12 cm duras, leñosas, con 5 costillas, de 10 a 15 cm de largo; revestido interiormente de pelos cortos rígidos y de color leonado. Las semillas son ovoideas, de color negro, miden 5 mm de largo por 3 mm de ancho y llevan una carúncula granulosa de color amarillo (Fig.4) (<http://www.financierarural.gob.mx>).



**Fig.1.- Árbol Flor de Manita  
(*Chiranthodendron pentadactylon*)**



**Fig.2.- Flor de manita. Imagen de la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)**



**Fig.3.- Hojas de manita. Hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), vista lado anverso y reverso de la hoja.**



**Fig.4.- Fruto del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).**

Al árbol flor de manita se le ha asignado la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae; Subreino: Tracheobionta; División: Magnoliophyta;  
Clase: Magnoliopsida; Subclase: Dilleniidae; Orden: Malvales; Familia: Malvaceae;  
Subfamilia: Bombacoideae; Género: *Chiranthodendron*; Especie: *pentadactylon*  
(<http://es.wikipedia.org>).

La flor de manita también es conocida como: manita, macpalxochitl (flor de palma de la mano), mano de león, majagua, mano de mico, mano de león, tayuyo (Méndez, 2006).

## **2.2.- Usos del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) en la medicina tradicional.**

En el siglo XVI, Martín de la Cruz califica a la flor de manita como analgésico. El Códice Florentino relata: “sirve para el que escupe sangre, al igual que para los que tienen cerrada la cámara (estreñimiento)”. En el mismo siglo, Francisco Hernández describe: “la planta es de naturaleza fría y húmeda, su corteza machacada y untada con agua resuelve los tumores”.

A finales del siglo XVIII, Vicente Cervantes, refiere: "los indios de Toluca usaban la infusión de las flores para mitigar las inflamaciones de los ojos y aliviar el dolor de las almorranas".

Casi a finales del siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural reporta los siguientes usos: como auxiliar en el dolor de muela, astringente, catártico, emoliente; para curar las enfermedades de los ojos, y analgésico. El Instituto Médico Nacional repite la información de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, agregando su uso como antiinflamatorio y para curar los humores (<http://www.mexicodesconocido.com.mx>).

Finalmente, en el siglo XX Maximino Martínez la califica contra: las afecciones cardiacas, como antiepiléptico, curativo de enfermedades de los ojos y analgésico ([www.velvet.unam.mx](http://www.velvet.unam.mx)). La flor de la manita recibe un uso frecuente para curar malestares del corazón en regiones del centro y sur de México (en estados como Guanajuato, Michoacán, Oaxaca y Chiapas); en estados como Hidalgo es usada para regular la presión arterial; además se utiliza para el dolor de cabeza, mareos y el postparto y que el niño suspire (solloce) demasiado, ataques (<http://www.mexicodesconocido.com.mx>).

La flor de manita es utilizada para calmar los nervios, preparada en té, junto con hojas de yoloxóchitl (*Talauma mexicana*), magnolia (*Magnolia sp.*), azahar (*Citrus spp.*), toronjil blanco y morado (*Agastache mexicana*) y toronjil azul o chino (*Dracocephalum moldavica*), o mezclada con tila (*Trenstroemia spp.*), azahar de naranjo (*Citrus spp.*), hinojo (*Foeniculum vulgare*) y menta (*Mentha piperita*). En el estado de Michoacán la flor hierve con floricuerno, damiana californica, pasiflorina y flores de azahar, de esta infusión se bebe una taza en la mañana y otra en la noche, con el fin de "calmar los nervios", (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>).

El uso de las flores está indicado por vía oral para el tratamiento de afecciones cardiacas y epilepsia. Por su actividad puede combinarse con agastache (toronjil), granadilla, hinojo, menta, naranja y pitaya. El cocimiento de las flores frescas o secas se recomienda para tratar afecciones del corazón, diarrea, enfermedades nerviosas y epilepsia.

La infusión de las hojas y corteza se usan como cataplasma para el tratamiento de úlceras crónicas, hemorroides y oftalmia.

A las flores y hojas se les atribuye propiedad analgésica, antiepiléptica, antiinflamatoria, astringente, cardiotónica, diurética y emoliente (Méndez, 2006).

### **2.3.- Propiedades Farmacológicas del árbol Flor de Manita (*Chiranthodendron penradactylon*).**

Esta planta originaria de México goza de un uso muy antiguo. Su aplicación como estimulante cardiaco ha sido validada experimentalmente. Sin embargo la cantidad de propiedades que se le han adjudicado a esta planta han sido objetivo de una cantidad de estudios científicos, que se describen brevemente a continuación:

**2.3.1.- Acción Anti-colinérgica:** Un extracto polar de las flores, administrado por vía intraperitoneal en ratón a la dosis de 300mg/kg, ejerció un efecto anticolinérgico, observándose piloerección, ligera pérdida del tono muscular, catatonía y aumento del diámetro pupilar (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>).

**2.3.2.- Actividad Anti-espasmódica:** En el año de 1989, se estudió la actividad antiespasmódica, por medio de la extracción acuosa de las flores, como infusión (fase I), en la cual el resultado fue positivo para esta actividad (Méndez, 2006). En otro ensayo, a la flor de *Chiranthodendron pentadactylon* se le evaluó esta misma propiedad, en íleon aislado de rata frente a diversos espasmógenos, encontrándose los siguientes porcentajes de inhibición de la contracción: contra carbacol (9.31 %), BaCl<sub>2</sub> (-1.42 %), histamina (78.99 %) y serotonina (51.52 %) (Velázquez, 2006).

**2.3.3.- Actividad Diurética:** La infusión acuosa preparada con hojas y flores de manita, recolectada en su hábitat natural posee acción diurética, investigación realizada en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de Guatemala, en el año de 1991 (Méndez, 2006).

**2.3.4.- Actividad Anti-inflamatoria:** Estudios de la actividad antiinflamatoria por los métodos de: provocación de edema y medición de la circunferencia del edema y producción de granuloma, en dosis de 40mg de un extracto al 20% de la flor, en el primer método se mide la circunferencia después de 5 horas de provocada la irritación y en el segundo se implanta una bola de algodón en el tejido subcutáneo y luego se administra por dos días 40 mg de extracto; con los dos métodos se obtuvo actividad antiinflamatoria. En otro estudio se administraron dos dosis (750 y 1000 mg/kg) de la infusión al 10%, se provocó edema la administración de una solución de caolín y se mide el edema por pletismografía digital. El análisis de los resultados indica que no hay diferencia significativa, por lo que no tienen actividad antiinflamatoria. La actividad antiinflamatoria en diferentes estudios ha mostrado datos un tanto discrepantes entre ambos estudio, por lo que su actividad no ha sido plenamente demostrada (Méndez, 2006).

**2.3.5.- Actividad Analgésica:** La infusión al 10% de las hojas de *Chiranthodendron pentadactylon* (Manita) a dos dosis de estudio (750 y 1000 mg/kg) mostraron que presentan acción analgésica, observándose una mayor acción a la dosis de 1000 mg/kg a los 90 minutos después de la administración de la misma, manteniendo ambas dosis un efecto mayor comparado con el grupo control al que se le administro dextrosa al 5% (Méndez, 2006).

**2.3.6.- Actividad Anti-protozoarias:** El estudio realizado con las flores de *Chiranthodendron pentadactylon* contra los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* con DE<sub>50</sub> de 2.5 µg/mL; mostró resultados positivos; comprobando su actividad anti-protozoaria (Velázquez, 2006).

**2.3.7.- Actividad Anti-bacteriana:** En el estudio se le demostraron las propiedades antibacterianas de las flores del árbol flor de manita contra ocho cepas de enterobacterias causantes de diarrea evaluado a 8 mg/mL, encontrándose los siguientes resultados de porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano: *Escherichia coli* ATCC 25922 (56.8 %), *Escherichia coli* 0157:H7 (59.0 %), *Shigella sonei*-1 (73.3 %), *Shigella Sonnei*-2 (71.4 %), *Sh. flexneri*-1 (42.9 %), *Sh. flexneri*-2 (51.5%), *Salmonella sp*-1 (50.0 %), *Salmonella sp*-2 (50.0 %) (Velázquez, 2006).

**2.3.8.- Actividad Vasoactiva:** El estudio se realizó con el extracto acuoso de las flores en el cual se midió el efecto vasoactivo a dosis de entre 0.5-12 mg/mL sobre la aorta torácica aislada de rata, pre-contráida con noradrenalina, donde se observó actividad moderada (Velázquez, 2006).

**2.3.9.- Actividad Anti-diarreica:** en el estudio se evaluó la capacidad antisecretora de toxinas de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* en intestino de rata evaluándose 26 plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional; incluidas en este estudio las flores del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), se utilizaron extractos acuosos y metanólicos de las plantas a estudiar a una dosis de 300 mg/Kg administrándose a los animales por vía oral; los resultados para la flor de manita fueron: el extracto metanólico presentó un porcentaje de inhibición de la diarrea de  $87.6 \pm 15.3$ ; mientras que para el extracto acuoso, éste presentó un porcentaje de inhibición de la diarrea de  $84.8 \pm 17.4$ . La actividad antisecretora mostrada por *Chiranthodendron pentadactylon* explica en alguna medida su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de la diarrea (Velázquez, 2006).

#### **2.4.- Toxicidad de la Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).**

Se realizaron estudios en ratones con el fin de determinar la toxicidad de la flor de manita, la dosis máxima usada en el estudio fue de 3 g/Kg; arrojando como resultados que las infusiones de flores no poseen toxicidad aguda en el ratón por vía oral hasta una dosis de 3g/kg (Méndez, 2006). En otro estudio realizado se determinó la toxicidad aguda del extracto metanólico de las flores de *Chiranthodendron pentadactylon* (300, 600, 1200, 2400, 4800 mg/kg), durante los dos días en que transcurrió el experimento no se observó mortandad de los animales, es importante hacer notar que la dosis de 4800 mg/kg es el equivalente a consumir 18 tazas de té en una sola toma. Tampoco se observó daño macroscópico en los órganos observados (estómago, intestino, hígado, pulmón y corazón) (Velázquez, 2006).

## 2.5.- Componentes activos y actividades biológicas relacionadas

Los principios activos son los que definen y sirven para clasificar a las plantas y el principal criterio para su selección y mejora, el control de rendimiento y calidad de productos del cultivo, procesado industrial, así como los que dotan a la planta de sus propiedades y usos terapéuticos. En un vegetal superior las hojas constituyen uno de sus órganos más interesantes, pues en ellas tiene lugar la mayoría de los procesos metabólicos de la planta; parte de estas hojas, reciben la savia bruta a través del tallo, mediante la acción de unos complejos enzimáticos o fermentos que contienen, elaboran dos clases de compuestos nitrogenados: proteínas y alcaloides que son principios activos de acción fisiológica, específica y energética; por lo que constituyen en eslabón ineludible en la cadena de la vida animal (Muñoz, 2002).

La planta medicinal utiliza los cuatro elementos clásicos: agua, tierra, aire, fuego (energía solar que equivale a calor y luz) para elaborar los principios inmediatos o alimenticios, prótidos, glúcidos y lípidos, los ácidos orgánicos, vitaminas y todos los principios activos o medicinales, así como concentrar los elementos minerales del suelo. De estos hechos se desprende el valor alimenticio de ciertos órganos de las plantas medicinales, cuyos principios activos se acumulan en otros órganos, determinados en cada especie, llamados drogas. Su aprovechamiento integral, suministra alimento y medicina (Muñoz, 2002).

A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos componentes ya que éstos por separado poseen mucha menor actividad que cuando se encuentran juntos. Se considera que la toxicidad de los extractos es más reducida cuando se encuentran purificados, este fenómeno se denomina amortiguación (*buffering*). En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, estas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes, entre los que destacan: terpenos, aceites esenciales, cumarinas y flavonoides (Shiva, 2007).

### 2.5.1.- Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Martínez y col., 2002), el consumo promedio de fenoles en los países europeos se estima en 23 mg/día. No se han reportado hasta ahora efectos tóxicos cuando se consumen relativamente grandes cantidades de flavonoides (Martínez, 2005). Los flavonoides, uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- $\gamma$ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C6-C3-C6, designadas como A, B y C. Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides (Gracia, 2007; Martínez, 2005).

Dentro de las plantas los estudios han mostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glicósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina agliconas flavonoides. Los glucósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar (Martínez, 2005).

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto: el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena C3 provienen de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicliza y se condensa con una molécula de ácido p-cumárico.

La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonilCoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. Estas a su vez son los precursores de las demás clases de flavonoides. Es importante recalcar que este proceso de biosíntesis sustenta el hecho de que en la mayoría de flavonoides el anillo A como meta-oxigenado, es decir como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonilCoA; y por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es orto-oxigenado (Martínez, 2005; Vanaclocha, 2006).

El flavonoide quercitina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4,7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C y tiene una hidrosolubilidad similar a la de la vitamina E. La función antioxidante de la quercitina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C (Martínez y col., 2002).

En ratas se ha podido observar que la quercitina mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y reduce la incidencia de trastornos de la conducción cardíaca. La quercetina ha mostrado efectos antiinflamatorios. La inflamación es mediada parcialmente por la liberación de histamina. La quercetina puede estabilizar las membranas de las células que liberan la histamina, reduciendo su liberación. También afectan la síntesis de leucotrienos (Martínez, 2005).

La quercetina también inhibe la enzima que convierte glucosa en sorbitol, un compuesto que está relacionado con las complicaciones diabéticas, incluyendo las cataratas. Varios compuestos químicamente relacionados con la quercetina han mostrado que inhiben la formación de cataratas en animales diabéticos. La quercetina también mejora la secreción de insulina y protege las células pancreáticas del daño por radicales libres. También existen estudios que demuestran su acción benéfica en el tratamiento de tumores en próstata (Martínez, 2005).

Los flavonoides presentan actividad antimicrobiana; la mayoría de los flavonoides que no contienen algún azúcar en su estructura mostraron actividad inhibitoria hacia microorganismos probados (Tabla. 1) (Narayana y co.l, 2001).

En la siguiente tabla se resumen algunos flavonoides con actividad antimicrobiana, así como los microorganismos contra los cuales dichos compuestos son activos.

Desde el punto de vista fitoquímico la flor de manita ha sido objeto de algunas investigaciones las cuales han conducido al aislamiento e identificación de algunos compuestos. Dos compuestos de tipo hidrocarburo (octacosano y 1-docosanol); dos azúcares (glucosa y sacarosa); un fenol simple (ácido gálico) un esteroide ( $\beta$  sitosterol); y ocho flavonoides (cianidina 3-O-glucósido, apigenina 5, 7, 4' tri-O-glucósido, leucocianidina, luteolina 7-O-glucósido, luteolina 7-O-glucurónido, quercetina 3-O-glucósido, gossipetina, gossipetina 3-O-glucurónido) (Velázquez, 2006). Estudios químicos de esta planta mencionan que contiene gran cantidad de mucílago. Contiene un pigmento rojo constituido por un glucósido compuesto por una aglicona, más 3 moléculas de glucosa y 3 de ácido gálico. En las flores se detectó la presencia de un alcaloide y de un glucósido (Ruiz, 2000).

**Tabla 1.- Flavonoides con actividad antimicrobiana.**

Organismo	Flavonoides
Actividad Antibacterial	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Quercetina, baicalina, quercetogetina, herpertina, fisetina, iso-liquiritigenina, naringina+rutina, naringina+herpertina.
<i>Staphylococcus albus</i>	Fisetina
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Apigenina
<i>Streptococcus viridans</i>	Apigenina
<i>Streptococcus jaccalis</i>	Crisina
<i>Streptococcus baris</i>	Crisina
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Crisina
<i>Shigella boydii</i>	Hespertina, naringina+rutina, naringenina+herpertina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rutina, naringina, baicalina, hidroxietilrutosido
<i>Escherichia coli</i>	Quercetina
<i>Bacillus subtilis</i>	Quercetina
<i>Bacillus anthracis</i>	Rutina
<i>Proteus vulgaris</i>	Datisentina
<i>Clostridium perfringens</i>	Hidroxietilrutosido

En un estudio realizado al extracto de flor de manita; al cual se le determinaron los fenoles totales, utilizando una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL), así como la cantidad de flavonoides totales donde se utilizó una solución estándar de catequina. De dicho estudio se obtuvieron como resultados una concentración de fenoles totales de  $221.481 \pm 0.630$  mg GA/g extracto y extracto una concentración total de flavonoides de  $164.178 \pm 0.089$  mg cat/g; por lo que se ha deducido que la alta concentración de estos componentes puede explicar algunos de los usos de esta planta en la medicina tradicional mexicana (Gracia, 2007).

### **3.- Plantas y Farmacodinamia**

El término dinamia procede del griego y significa fuerza, potencia. La farmacodinamia es la parte de la Farmacología encargada de estudiar cómo actúan los medicamentos (mecanismo de acción), con qué intensidad producen esa acción (potencia) y en qué medida se producen esas consecuencias (Durán, 2008).

Las plantas medicinales son fuentes naturales valiosas, y, apreciadas como drogas potencialmente seguras, por tal motivo han sido estudiadas para probar su actividad biológica, antimicrobiana e hipoglucemiante ya que también juegan un papel importante en la medicina moderna (Viji y col., 2012).

#### **3.1.- Fitoterapia**

Fitofarmacología es la rama de la Farmacología que se orienta al estudio de los extractos estandarizados de plantas medicinales (Morales, 2009). La Fitoterapia Moderna o Fitomedicina, se nutre del desarrollo de la Fitofarmacología básica y clínica, esto es de los estudios farmacológicos realizados con plantas o sus componentes y lo que la lleva a fundamentarse en el uso racional y científico de productos vegetales con finalidad terapéutica (Morales, 2009).

La Organización Mundial de la Salud, OMS, ha definido Fitomedicina como la aplicación de principios activos de origen vegetal en terapéutica, basado en el conocimiento científico moderno, esto es una base que se sostiene en los pilares

fundamentales de la farmacología y la terapéutica moderna: farmacodinamia, farmacocinética, estudios preclínicos, clínicos y la divulgación de éstos a través de medios reconocidamente validados por las comunidades científicas. En la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población utiliza medicina alternativa herbolaria (Fitoterapia) como tratamiento paralelo a la medicina tradicional y su uso ha estado siempre muy arraigado a la tradición (Morales, 2009).

El término fitofármaco no debe confundirse con el de planta medicinal. Al respecto, la OMS ha precisado el significado de fitofármaco como: “productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales (Morales, 2009).

En lo que se refiere estrictamente a la fitoterapia, la acción farmacológica de una determinada planta medicinal depende en la mayoría de los casos de varios principios activos y no sólo de uno aislado, existiendo sinergismos y acciones coadyuvantes entre ellos, de modo que por lo general resulta más adecuada la acción de toda la planta en su conjunto que la de un determinado compuesto (Vanaclocha, 2003).

Para llegar a elaborar un fitofármaco se requiere un largo proceso con implicación de especialistas de diferentes ramas, pero sin lugar a dudas el punto de partida radica en la identificación y recolección correcta de la masa verde a trabajar. La participación de botánicos o personal debidamente entrenado es esencial ya que no solamente es necesario conocer cada planta sino también se hace imprescindible el dominio de otros elementos que pueden modificar sus propiedades (Rodríguez, 1998).

La droga vegetal se procesa con la finalidad de viabilizar su uso farmacéutico en la elaboración de fitofármacos y su empleo clínico directo, siendo este último el más difundido popularmente. El procesamiento al cual se someten las drogas vegetales varía de acuerdo a la localización, estructura química y estabilidad de las sustancias químicas contenidas en la planta que reviste interés terapéutico, un

proceso importante para obtener un fitofármaco es la separación de los principios solubles se realiza con el objetivo de obtener los extractos que permitan conservar los componentes útiles de la droga de forma concentrada, uniforme y permanente. Entre muchas de las ventajas que ofrecen los fitomedicamentos está la de no causar efectos secundarios como suele ocurrir con algunos productos alopáticos (Rodríguez, 1998, <http://www.salud180.com>).

Con la gran importancia que ha cobrado el uso de la fitoterapia a nivel mundial es necesario que los países que la practican den un salto cualitativo en el uso de fitomedicamentos, es decir, que es necesario que paralelamente a las investigaciones en el área de la fitoquímica y en el área de la farmacología, los fitomedicamentos que se venden sean de calidad controlada, o sea que tengan su constitución química bien definida y su actividad farmacológica bien establecida, así como, su nivel de toxicidad y la posibilidad de provocar reacciones adversas bien definidas, lo que conlleva a que los fitomedicamentos sean tratados como medicamentos iguales a aquellos cuya obtención se realiza a partir de síntesis (Sharapin, Camacho, 2000).

Existe un amplio cúmulo de especies vegetales, cuya acción terapéutica aún no se ha confirmado. Es por eso que la herbolaria mexicana representa un recurso viable para encontrar nuevos tratamientos contra las enfermedades degenerativas, como el cáncer, la artrosis, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes, etcétera (Figuroa, 2009).

En México se encuentra El Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBS), del Instituto Mexicano del Seguro Social, donde se desarrollan diversos fitomedicamentos que pueden ser la respuesta a enfermedades como la hipertensión arterial, infecciones producidas por hongos en las uñas (tiña), ansiedad y padecimientos crónico degenerativos como la diabetes. Creado en 1985, es el único centro de investigación en el continente americano que realiza un trabajo integral basado en la medicina tradicional mexicana y en la investigación farmacológica, fotoquímica, biotecnológica y clínica toxicológica de las plantas medicinales (<http://www.salud180.com>).

### 3.2.- Fármacos

La legislación habitualmente define a un fármaco como cualquier sustancia (no alimenticia) semi sintética o sintética que interactúa con organismos vivos para modificar un proceso o respuesta biológica y producir así, un efecto farmacológico (Mendoza, 2008). En un sentido más restringido un fármaco es toda sustancia química pura utilizada en el tratamiento, curación, prevención o diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado (Galbis, 2004). Es importante señalar que la mayoría de los fármacos se unen selectivamente a uno o varios componentes de la célula y modifican sus funciones, pero no se crean nuevas funciones celulares. Por otra parte es importante subrayar que en el español el término droga se emplea con frecuencia para referirse a fármacos de abuso (Mendoza, 2008).

Las posibles vías de entrada de los medicamentos al organismo se pueden en dos grandes grupos: vías entéricas o enterales y vías parenterales. En la administración enteral, el fármaco se coloca directamente en el tracto gastrointestinal, poniéndolo debajo de la lengua (sublingual), deglutiéndolo (Vía oral), o colocándolo en el recto a través del esfínter anal (rectal).

En la administración parenteral no se utiliza el tubo digestivo. Las vías parenterales más comunes son la vía subcutánea, la intramuscular, y la intravascular o endovenosa. Igualmente, los medicamentos se pueden aplicar a la piel y a las mucosas o, inyectarse en forma intradérmica para ejercer efecto local u obtener absorción percutánea. Además de esto, se pueden inyectar dentro del canal raquídeo o sus cercanías, en una arteria, cerca de un tronco nervioso, en una articulación o en el espacio pleural, así como introducir en la vagina. También se pueden inhalar para su acción directa en el árbol branquial o lograr su paso de los alvéolos a la sangre (Sáenz, 1993).

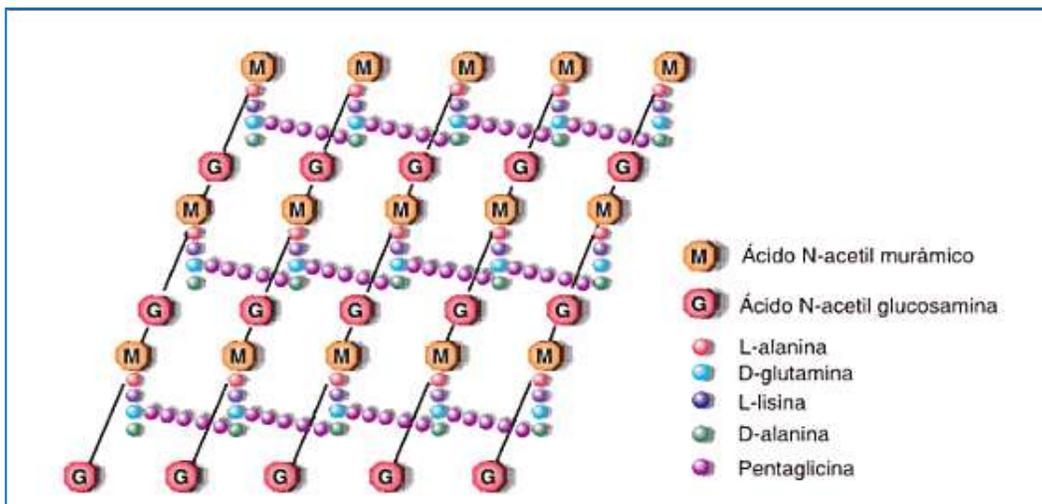
La administración del fármaco es un proceso que se incluye en la cinética del medicamento (farmacocinética) la cual estudia la acción del cuerpo sobre un fármaco. La farmacocinética comprende la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de un fármaco. Estos procesos se resumen con el acrónimo mnemotécnico ADME. En ocasiones se incluye también la liberación del principio activo en este caso se utiliza en acrónimo LADME (Baños y col., 2002).

#### **4.- Clasificación de Bacterias**

La pared bacteriana puede visualizarse mediante una técnica de tinción bacteriana de tipo diferencial, descubierta por el científico danés Christian Gram. Ésta coloración se basa en la capacidad de las bacterias de retener al colorante primario (cristal violeta), aun después de haber sido decoloradas con alcohol acetona. Como esta coloración se clasifica como compleja y diferencial, el resultado de la técnica clasificará a las bacterias en bacterias Gram positivas (color violeta) y bacterias Gram negativas (color rojo claro o rosado) (Montoya, 2008).

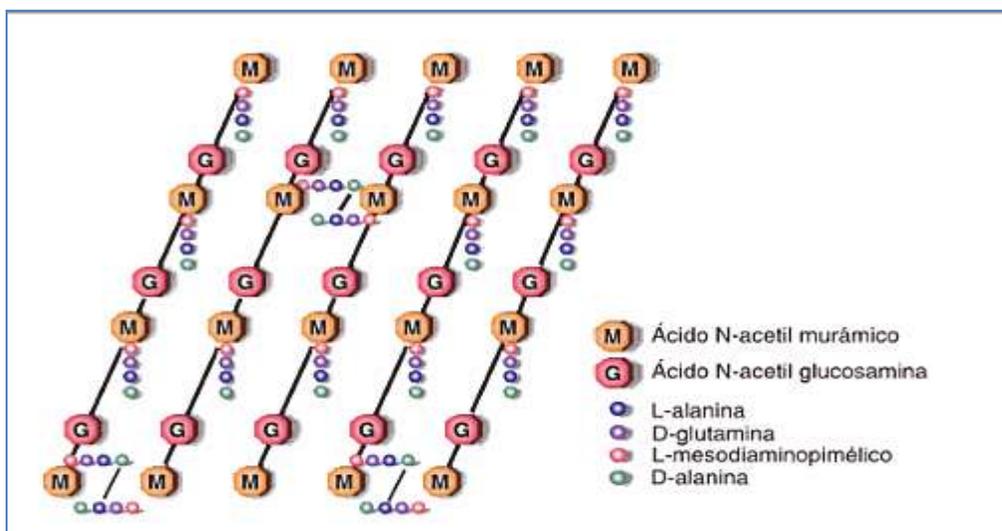
La pared celular de las bacterias consiste en una matriz de disacáridos enlazados mediante cadenas cortas de aminoácidos (péptidos). La pared celular de las bacterias Gram positivas tiene un espesor que oscila entre 15 y 30 nm, y consiste en una sola macromolécula de este tipo, denominada peptidoglicano (se llega a mencionar con los nombre de mureína, glucopéptido, mucopéptido, mucocomplejo de Park o peptidoglicano). La pared celular de las bacterias Gram negativas tiene un espesor de unos 10 nm y posee una capa adicional (la membrana externa) formada, entre otras moléculas, por lipopolisacáridos unida a una capa de peptidoglicano (Santamarina y col., 2000; Montoya, 2008).

**4.1.- Bacterias Gram positivas:** la pared se identifica fácilmente debido a la gran cantidad de mureína, donde se da una secuencia de aminoácidos unidos al NAM (N- acetil murámico) en el orden: L- alanina (L- Ala); D- glutámico (D- Glu); L- lisina (L- Lys); D- alanina (D- Ala) (Fig.5). Solo en estas bacterias se encuentran los ácidos teicoicos. Anclados a la membrana, por un glucolípidio se encuentran los ácidos lipoteicoicos (ALT). Éstos y los ácidos teicoicos son los responsables de la carga negativa externa que presentan estas bacterias (Montoya, 2008).



**Fig.5.- Pared de las bacterias Gram positivas**

**4.2.- Bacterias Gram negativas:** la ubicación de la pared en este tipo de bacterias, se describe desde el exterior hacia el interior de la bacteria, de la siguiente forma: la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana citoplasmática. En el espacio periplásmico se encuentra inmerso el peptidoglicano o pared celular. En estos microorganismos la composición y estructuración del peptidoglicano es bastante similar a la de las bacterias Gram positivas, sin embargo, su espesor es menor y predominan las proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos. En este caso, los enlaces interpeptídicos son directos, mediados también, por una pentaglicina y el aminoácido L-lisina es sustituido por el ácido meso-diaminopimélico (m- DAP) (Fig.6). Los lipopolisacáridos desempeñan un papel importante, actuando como barrera frente a determinados antibióticos, como la penicilina, que por esta razón es poco eficaz frente a estas bacterias (Montoya, 2008).



**Fig.6.- Pared de las bacterias Gram negativas**

En la tabla 2 se muestran en resumen características que permiten diferenciar a las bacterias Gram positivas de las bacterias Gram negativas.

**Tabla 2.- Algunas características de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Montoya, 2008).**

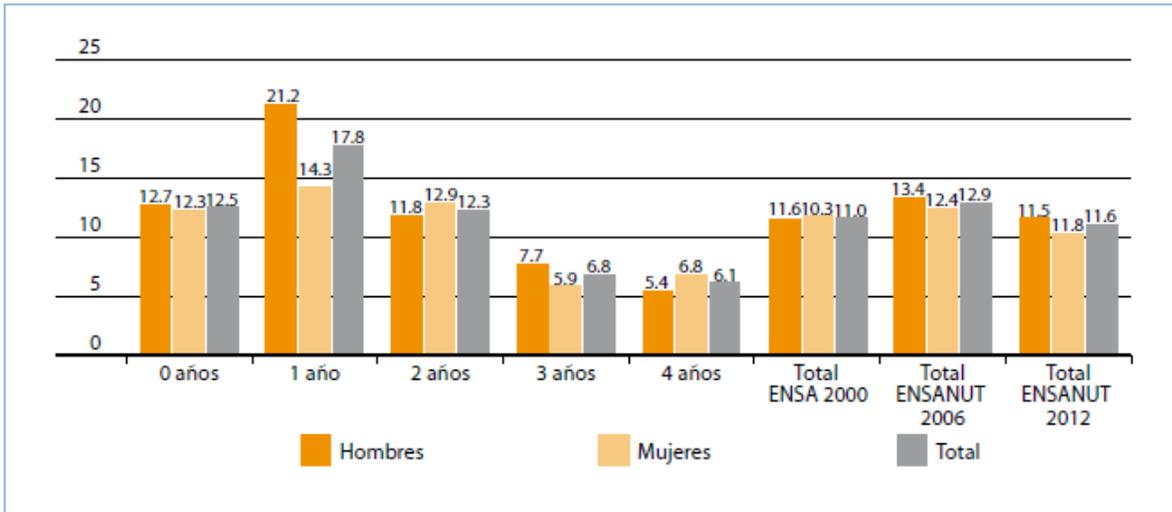
Características	Gram Positivas	Gram Negativas
Estructura de la pared celular	Gruesa (15-80 nm)	Delgada (10-15 nm) triple capa-multicapa
Composición de la pared celular	Baja en lípidos (1-4%). Peptidoglicano presente formando monocapa; es un componente importante que supone 50% del peso seco de algunas células bacterianas. Presencia de ácidos teicoicos	Alto en lípidos (11-22%). Peptidoglicano presente en una capa interna rígida; poca cantidad. Representa 10% del peso seco. No hay ácidos teicoicos
Susceptibilidad a la penicilina	Más susceptibles	Menos susceptibles
Frenado de crecimiento por colorantes básicos, por ejemplo cristal violeta	El crecimiento se retrasa notoriamente	El crecimiento se retarda menos
Requerimientos nutricionales	Relativamente complejos en muchas especies	Relativamente sencillos
Resistencia a la rotura mecánica	Más resistentes	Menos resistentes

#### **4.3.- Generalidades de la diarrea infecciosa**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año tienen lugar 1,500 millones episodios de diarrea en países en vías de desarrollo, resultando de éstos en 1,5 millones de muertes. En 2001, la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos en el nivel nacional, y que los estados con mayor incidencia eran: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla, y el Distrito Federal. En México, un estudio gubernamental realizado en 2003, reportó 4, 556 decesos causados por infecciones intestinales (Castro y col., 2011).

De acuerdo con la ENSA 2000 y la ENSANUT 2006 y 2012, la prevalencia de diarrea en niños menores de cinco años fue de 12.6, 13.1 y 11.0% para 2000, 2006 y 2012, respectivamente.

En la ENSANUT 2012 las cinco entidades del país con las prevalencias más altas son Tabasco (18.9%), Yucatán (17.7%), Guerrero (15.5%), Baja California Sur (15.4%) y Estado de México (14.7%). En contraste, Hidalgo (7.0%), Sinaloa (7.2%), Guanajuato, Chihuahua (7.4%, cada uno) y Tamaulipas (7.5%) se distinguen por registrar las prevalencias más bajas; mientras que Michoacán presenta una prevalencia del 13.8% (México, ENSANUT 2012).



**Fig.7.- Distribución porcentual de la población de menores de cinco años que presentó enfermedad diarreica, según edad y sexo (México, ENSANUT 2012).**

En el 2008, el Seguro Social brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales, y los estados con mayor incidencia de estas infecciones fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero, y Oaxaca. De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones, como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus representan un severo problema de salud pública para nuestro país (Aguilera y col, 2011).

La diarrea se puede definir como un aumento anormal en el contenido del líquido de las heces y en el peso de las mismas (> 250 gr/día), unido generalmente a un aumento en el número de deposiciones (> 3 deposiciones /día) que suelen acompañarse de urgencia defecatoria, molestias anales y, en ocasiones, incontinencia. A veces se da una combinación de estas tres manifestaciones (López y col, 2006).

La clasificación de la diarrea de acuerdo con el agente causal puede ser de etiología bacteriana o viral y, según su manera de presentación, puede ser diarrea líquida (acuosa o secretora) y diarrea con sangre (invasiva o disentería).

**Diarrea acuosa o secretora:** La forma más común de gastroenteritis se caracteriza por evacuaciones intestinales frecuentes, más o menos líquidas. La forma más pura de diarrea acuosa es la producida por bacterias secretoras de enterotoxinas, como *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli enterotoxigénica*.

**Diarrea invasiva o disentería:** La disentería comienza con evacuaciones intestinales frecuentes, pero las heces son de menor volumen que en la diarrea acuosa y contienen sangre, moco y pus. La fiebre, el dolor abdominal y el tenesmo son síntomas habituales.

Las epidemias de diarrea en lactantes, niños y adultos suelen ser causadas por microorganismos presentes en el agua o en alimentos contaminados. Los microorganismos que causan disentería (*E. coli* diarreagénicas, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Rotavirus*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*), pueden provocar cambios inflamatorios y destructivos en la mucosa del colon, por invasión directa o mediante la producción de citotoxinas (<http://es.scribd.com>).

#### **4.4.- Enterobacterias**

Se le llama de esta manera a un grupo muy diverso de bacterias que tienen como hábitat natural el intestino del hombre y de varias especies animales. Esta familia está formada por bacilos Gram negativos de 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ ; no son esporulados, algunos tienen movilidad por flagelos peritricos, son aerobios y anaerobios facultativos. Muchos de ellos forman cápsulas, otros crecen flagelos, la mayoría producen fimbrias y pilis, ninguno fabrica esporas, y fermentan la glucosa con formación de ácido y algunos también gas. Todos son oxidasa negativos, algunos reducen los nitratos a nitritos y son catalasa positivos. Entre 20 y 25 especies son clínicamente significativas. Todos los miembros de esta familia tienen vida libre, se les pueda encontrar en aguas contaminadas, el suelo, el medio ambiente, plantas e insectos (Romero, 2007).

Las enterobacterias con patógenas para el hombre debido a la adquisición de factores de virulencia codificados en bacteriófagos, plásmidos o islas de

patogenicidad. En estos factores se incluyen adhesinas, hemolisinas y otras toxinas como el factor citotóxico de necrosis (CNF) o los antígenos capsulares. Algunas especies poseen sistemas complejos para la penetración de las células intestinales, como proteínas de membrana externa (*Shigella*), o disponen del sistema de secreción del tipo III (*E. coli* enteropatógena, *Salmonella entérica*, Y *Yersinia enterocolítica*). Otros porta-grupos producen enterotoxinas, como las toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) de *E. coli* enterotoxigénica y las verotoxinas o toxinas shiga-like de *E. coli* enterohemorrágica (Ausina y col., 2006).

#### 4.5.- Enfermedades gastrointestinales en México

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se las considera un problema de salud pública en el nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (Hernández y col., 2011).

Ciertas cepas de *Escherichia coli* pueden producir enteritis o gastroenteritis por seis mecanismos distintos, que conducen a seis síndromes clínicos diferentes. Estas cepas incluyen *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregante (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC).

**4.5.1.- *Escherichia coli*:** La *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) está asociada con dos síndromes clínicos importantes “diarrea del destete” en niños de los países en vías de desarrollo y “diarrea del viajero”. Tienen un inicio brusco típico con periodo corto de incubación (14-50 hrs). La diarrea acuosa profusa es el síntoma predominante (similar a *Vibrio cholerae*), casi siempre sin sangre, moco ni pus.

A menudo se acompaña por cólicos abdominales leves. La deshidratación y los vómitos ocurren en algunos casos (Koneman y col., 2008).

**4.5.2.- *Shigella dysenteriae*:** La shigelosis es la más contagiosa de las diarreas bacterianas. Los seres humanos sirven como hospedador natural, la enfermedad es transmitida por la vía feco-oral y se requieren tan sólo 200 microorganismos

viabiles para producir la enfermedad. La *Shigella dysenteriae* es la especie recuperada menos recuperada pero es el serotipo más virulento y el serotipo más frecuente aislado en los países en vías de desarrollo (Koneman y col., 2008).

#### **4.6.- Relación de bacterias con disentería**

La disentería se define como diarrea con sangre visible en las heces, es una causa importante de morbilidad y mortalidad por diarrea. Aproximadamente 10% de todos los episodios diarreicos en menores de 5 años son de este tipo, pero en relación a mortalidad puede causar hasta el 15% de todos los decesos por diarrea. La causa más importante y frecuente de disentería aguda es *Shigella*, especialmente *Shigella flexinery* y *Shigella dysenteriae* tipo 1. Otras causas incluyen *Campylobacter jejuni*, especialmente en lactantes y, con menor frecuencia, *Salmonella*; la disentería causada por estos últimos agentes generalmente no es grave. *E.coli enteroinvasiva* tiene características similares a la *Shigella* y puede causar disentería grave; sin embargo, la infección por este agente no es común, también pueden ser causa de esta enfermedad *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*. *Entamoeba histolitica* puede causar disentería en los niños mayores y adultos, pero rara vez en los menores de 5 años (Secretaria Nacional de Salud, 1995).

#### **5.- Actividad antimicrobiana**

Los mecanismos de exactos de acción antimicrobiana, de muchos extractos naturales, no se conocen de forma exhaustiva, pero se sabe que generalmente, deben su actividad bacteriostática o bactericida a la sobrecarga a la que someten a la membrana celular de los microorganismos, hecho que determina que pierda su control e integridad. Junto a su actividad antimicrobiana los extractos naturales poseen otras aplicaciones entre las que podemos destacar: antiinflamatoria, inmunomoduladoras, espasmolíticas y sedantes (Shiva, 2007).

### 5.1.- Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La CIM se define como la menor concentración del antimicrobiano que es bactericida o letal para al menos el 99,9% del inóculo original.

La Concentración Inhibitoria Mínima es parte de un acuerdo general en donde esta determinación debe formar parte de la investigación inicial de un nuevo antimicrobiano. La actividad inhibitoria normalmente se determina mediante una técnica de dilución o de difusión en disco (Davey y col., 2007).

Un antibiótico se considera adecuado para tratar una infección causada por una bacteria cuando, administrado en dosis terapéuticas (es decir, no tóxicas), alcanza en el foco de infección concentraciones cuatro o más veces superiores a la CIM (Prats, 2007).

### 5.2.- Evaluación *in vitro*

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana pueden clasificarse de acuerdo al resultado final que hay que determinar. El resultado final de la mayoría de pruebas realizadas en el laboratorio clínico es la inhibición (Davey y col., 2007).

En el laboratorio la CIM puede determinarse mediante técnicas de dilución en medio líquido, en medio sólido o por técnicas de gradiente de difusión, como el E-test. Es necesario realizar de forma rutinaria controles de calidad de las distintas técnicas de estudio de la sensibilidad o resistencia conocida (*S. aureus* ATCC 29213, 25923; *E. coli* ATCC 35218, 25922; *E. faecalis* ATCC 29212; *S. pneumoniae* ATCC 49619; *P. aeruginosa* ATCC 27853; *H. influenzae* ATCC 49766, 49247; *C. jejuni* ATCC 33560) (Prats, 2007).

5.2.1.- Método de dilución: En esta prueba el microorganismo es inoculado en una serie de tubos o pocillos que contienen una serie de concentraciones que suelen comenzar con una potencia de 2 y disminuye en una base  $\log_2$ ; hasta la concentración más baja estudiada (Davey y col., 2007). Se siembra la bacteria en los tubos, se incuban, y a las 18-24 hrs se observa el crecimiento. Se podrá ver que el caldo está transparente en los tubos donde hay mayor concentración de antibiótico porque el crecimiento de la bacteria ha sido inhibido.

El tubo con la menor concentración de antibiótico que ha inhibido la bacteria indica la CIM (Prats, 2007).

5.2.2.- Método de difusión en disco: en esta prueba se aplica un disco de papel que contiene una cantidad especificada del antimicrobiano en una superficie de agar que ha sido recientemente inoculada con un microorganismo. El antimicrobiano difunde en el medio a partir del disco, originando un halo de inhibición; se mide el diámetro de dicho halo y se relaciona de manera inversa con la CIM (es decir, cuanto más grande es el diámetro del halo de inhibición, más baja es la CIM y viceversa) (Davey y col., 2007).

5.2.3.- Epsilon-test (E-test): Es un método de dilución basado en la difusión de un gradiente continuo, predefinido y señalado en la tira de un antimicrobiano equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas a partir de una tira de plástico no poroso de 5 cm de largo por 5 mm de ancho a lo largo de la cual se dispone una concentración pre-definida de fármaco seco y estabilizado en una cara y una escala de CIM interpretativa en la otra, se coloca en la superficie del medio de agar inoculado con el microorganismo a estudiar. La placa se incuba según la atmosfera y el tiempo requerido del microorganismo en cuestión. Tras la incubación, se forma una elipse de inhibición del crecimiento alrededor de la tira; la CMI se lee en el punto de la escala donde la elipse cruza la tira (Davey y col., 2007; Prats, 2007).

### **5.3.- Evaluación *in vivo***

La investigación que se lleva a cabo mediante el estudio de un animal “completo” mediante la obtención de medidas utilizando medios mínimamente invasivos se considera *in-vivo* (Izquierdo, 2008).

En el terreno biomédico se ha empleado la experimentación *in- vivo* con animales desde tiempos remotos en investigación básica y aplicada, enseñanza y valoración de las acciones y los efectos farmacológicos y tóxicos producidos por compuestos químicos. En ciencia, *in-vivo* se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo (Repetto, 1995).

Para las pruebas *in-vivo* se emplean especies roedoras como la rata o el ratón; a menos que haya diferencias obvias en la toxicidad o metabolismo entre los machos y las hembras, es suficiente el uso sólo de los machos. En caso de estudios específicos de un sexo, habrá que usar el sexo correspondiente (Hernández y col., 2011).

La selección de la especie animal se realiza atendiendo a criterios de disponibilidad, sensibilidad y similitud. En relación con la disponibilidad o conveniencia, en general se utilizan animales pequeños por razones económicas que condicionan la infraestructura, consumo de alimentos, gasto de producto y eliminación de residuos. La comodidad de manejo, reproducción y suministro hacen que los más empleados sean rata, ratón, conejo, cobayo, hámster y perro. En líneas generales, las especies más convenientes para las administraciones por las vías oral y parenteral son la rata y el perro, raramente el ratón; para la aplicación tópica, el conejo, y para ensayos de sensibilización, el cobayo está siendo sustituido por el ratón (Repetto y col., 2009).

Los modelos *in vivo*, constituyen sistemas experimentales de gran utilidad en la investigación, por cuanto permiten la aplicación de técnicas de análisis que no pueden emplearse en el hombre por razones éticas. Por otra parte, estos modelos brindan informaciones que no pueden ser obtenidas mediante técnicas *in vitro* como los cultivos celulares, donde los resultados experimentales no siempre reproducen lo que ocurre en el organismo como un todo (Valdés y col., 2009).

Los ensayos *in vivo* se emplean a menudo sobre los ensayos *in vitro*, ya que son más adecuados para la observación de los efectos generales de un experimento en un sujeto vivo (<http://translate.google.com.mx>).

En las investigaciones farmacológicas los ensayos con animales de experimentación resultan imprescindibles para la búsqueda y aplicación de posibles medidas terapéuticas encaminadas tanto a la prevención como al tratamiento de la enfermedad. Estos ensayos, una vez realizados, permiten medir la eficacia y seguridad de determinado producto ya sea de origen sintético o natural (Valdés y col., 2009).

#### 5.4.- Farmacología de los procesos diarreicos

El tratamiento de la diarrea dependerá siempre del diagnóstico y la severidad de la misma. En cualquier circunstancia, la primera medida terapéutica es la rehidratación por vía oral; en casos de gravedad, esta hidratación se realizará por vía intravenosa. Según la OMS el preparado recomendado para la hidratación contiene, por litro de agua, 20 gr de glucosa, 1,5 gr de cloruro potásico, 3,5 gr de cloruro sódico y 2,5 gr de bicarbonato sódico (Organización Panamericana de la Salud, 2008).

Como fármacos antidiarreicos, y según su mecanismo de acción, se encuentran:

- **Inhibidores de la motilidad gastrointestinal**

**Opiáceos:** codeína, loperamida y difenoxilato: Los opiáceos utilizados como antidiarreicos ejercen su acción gastrointestinal por activación de los receptores MOR (receptores opioides  $\mu$ ) y DOR (receptores opioides  $\delta$ ) situados en la pared del tubo digestivo. Inhiben la motilidad gastrointestinal por aumento del tono y reducción de la motilidad del antro gástrico y del píloro; como consecuencia, se produce un vaciado del estómago. Aumentan el tono y las contracciones no propulsivas en el intestino delgado y colon, dificultando el avance de la masa fecal, por lo que se incrementa el tiempo de contacto con la mucosa y la reabsorción de agua; como consecuencia se endurece el contenido y se enlentece su avance.

Los opiáceos actúan como antidiarreicos a dosis que no producen analgesia y esta acción es más intensa por vía oral. Los opiáceos se utilizan como tratamiento sintomático de la diarrea, nunca como tratamiento principal de la enfermedad.

La **codeína** atraviesa bien la barrera hematoencefálica y sufre metabolización hepática. No ha de administrarse en caso de síndrome de colon irritable y diverticulosis porque aumenta la presión intraluminal y las contracciones musculares. La dosis de codeína puede llegar hasta 60 mg 3 veces al día, administrada por vía oral (López y col., 2006).

La **loperamida** se absorbe bien por vía oral y atraviesa mal la barrera hematoencefálica, por lo actúa en el sistema gastrointestinal sin producir efectos en el SNC. Su acción es prolongada, que tiene una semivida de 11 hrs.

Se metaboliza en el hígado. La pauta terapéutica habitual con loperamida en la diarrea aguda es de una dosis inicial de 4 mg; cada vez que haya una defecación se podrá aumentar 2 mg más hasta un máximo de 16 mg al día (López y col., 2006)

El **difenoxilato** se absorbe bien por vía oral; en dosis bajas presenta acción antidiarreicas y en dosis superiores a las indicadas para la diarrea produce efectos a nivel central. La dosis inicial recomendada de difenoxilato para la diarrea es de 10mg, seguida de 5 mg cada 6 hrs (López y col., 2006). Sus efectos secundarios son infrecuentes aunque moderadamente importantes y en tratamientos prolongados llegan a presentarse con frecuencia dolor abdominal, flatulencia, dispepsia, náuseas, vómitos, estreñimiento, sequedad de boca, distensión abdominal, íleo paralítico o megacolon tóxico, retención urinaria. Somnolencia y mareo; los niños son más propensos (Calvo, 2008).

- **Inhibidores de la secreción gastrointestinal.**

**Octreótida:** inhibe la secreción de ácido y pepsinógeno en el estómago, inhibe la secreción de líquidos y bicarbonato a nivel intestinal y disminuye la contractilidad del músculo liso. La dosificación debe individualizarse comenzándose por 50 µg dos veces al día e ir incrementando paulatinamente la dosis hasta alcanzar entre 100-400 µg al día, pudiéndose llegar hasta un máximo de 1500 µg al día.

**Subsalicilato de bismuto:** se utiliza principalmente para la prevención y tratamiento de la diarrea del viajero, disminuye el número de deposiciones por reducir las secreciones intestinales, así como el dolor abdominal.

**Racecadotril o acetorfán:** el racecadrotil actúa inhibiendo las encefalinas intestinales, por lo que se reduce la secreción de agua y electrolitos al intestino. Se ha demostrado que reduce el volumen, la frecuencia de las deposiciones y también la duración de la diarrea (López y col., 2006). Entre sus efectos adversos presentan: dolor en el sitio de inyección. Náuseas, vómitos, dolor abdominal, flatulencia. Alteración del metabolismo hidrocarbonado por su capacidad de alterar la liberación de insulina y glucagón. Colelitiasis en el 10-20% a largo plazo (Calvo, 2008).

- **Agentes adsorbentes.**

**Carbón activado, tanatos, resinas de intercambio iónico:** son sustancias capaces de adsorber toxinas y microorganismos del tracto digestivo mediante un proceso físico de adsorción de micropartículas, tienen poco efecto sobre el volumen de las heces pero afectan significativamente a su consistencia. Son productos en general biológicamente inertes, por lo que son seguros (López, 2006). En general no tienen efectos secundarios; raramente presentan reacciones de hipersensibilidad (Calvo, 2008).

- **Antiinfecciosos intestinales.**

Se emplean para el tratamiento de diarreas infecciosas de origen bacteriano, por lo que su uso queda limitado a diarreas por infección sistémica grave (López, 2006).

- **Agentes antibacterianos**

Tratamiento contra ETEC: en todos los grupos el tratamiento está dirigido al reemplazo de líquidos y electrolitos como terapia de mantenimiento, ya que la enfermedad se autolimita por sí sola en casi todos los pacientes a la semana de haberse instalado. La combinación de trimetropim-sulfametoxazol (TMP-SMX) más loperamida o ciprofloxacino, ha sido efectivo en pacientes adultos, aunque esto no es válido en pacientes pediátricos por las restricciones del uso de la loperamida y ciprofloxacino en estas edades. La dosis del TMP-SMX es de 5 a 8 mg/Kg cada 12 hrs vía oral por 3 a 5 días. El subsalicilato de bismuto ha sido de utilidad en disminuir la severidad del cuadro intestinal (Romero y col., 2002).

Tratamiento contra EPEC: este se orientará fundamentalmente a la corrección de la deshidratación. Pocos datos existen acerca de la utilidad de antibióticos en la terapia adjunta a la rehidratación. Las excepciones son los recién nacidos y el desnutrido de tercer grado, que tiene mayor riesgo de desarrollar las formas más severas y graves de la enfermedad. La gentamicina parenteral, colistín (colimicina) y neomicina oral pueden reducir la morbi-mortalidad.

Otro antibiótico que ha mostrado ser de utilidad es el TMP-SMX con recuperación clínica más rápida. Otros tratamientos que han probado ser útiles incluyen el subsalicilato de bismuto (Romero y col., 2002).

Tratamiento contra EHEC: es de soporte, puesto que poco se conoce en lo referente a la terapia antibiótica; aunque la utilidad del uso de antibióticos no ha sido completamente estudiada es factible que el TMP-SMX pueda reducir la severidad y duración de la enfermedad (Romero y col., 2002).

Tratamiento contra EAEC: esta especie presenta una común resistencia a los antibióticos; el tratamiento óptimo para tratarla no ha sido hasta el momento determinado (Romero y col., 2002).

Tratamiento para diarrea causada por *Shigella*: el tratamiento de elección es la ciprofloxacina con una dosis de 500 mg, 2 veces al día/ 3 días, vía oral. Dentro de los tratamientos alternativos están azitromicina con dosis de 1-15 mg, una vez al día, de uno a 5 días, vía oral (Casanueva y col., 2008). El ácido nalidíxico es un tratamiento alternativo la dosis recomendada es de 55 mg/Kg/día dividida en cuatro dosis por cinco días. La mayoría de de las cepas de *Shigella* que son resistentes a la ampicilina, trimetropim-sulfametoxazol y a ácido nalidíxico son tratadas con cefalosporinas de tercera generación (Romero, 2007).

## II.- JUSTIFICACION

En México las enfermedades gastrointestinales que incluye la diarrea, constituyen un problema de salud. El uso indiscriminado de antibióticos, tratamientos con repetidas dosis diarias así como los efectos secundarios adversos que acarrear dichos tratamientos hacen que la búsqueda de alternativas terapéuticas como tratamiento para esta y otras enfermedades se evoque en las plantas medicinales.

Nuestra cultura está basada en el uso empírico de la medicina tradicional, por lo que es clara y obvia la necesidad de investigar científicamente los beneficios de nuestra cultura herbolaria. En particular del árbol flor de manita existen varios reportes de las propiedades farmacológicas de la flor, pero no existen reportes de las hojas además de acción diurética y como analgésico. En Michoacán las hojas del árbol de flor de manita son utilizadas contra enfermedades gastrointestinales, sin embargo, hasta donde sabemos no existen reportes farmacológicos que sustenten esta propiedad y que validen su uso terapéutico, por lo anterior se planteo la siguiente hipótesis.

## III- HIPOTESIS

Los extractos de las hojas del árbol de Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) presentan actividad anti-diarreica.

## IV.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana *in-vitro* y la actividad anti-diarreica *In-vivo* de las hojas del árbol flor de manita.

## V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar la actividad antibacteriana *in-vitro* del extracto crudo, la fracción sin pigmentos y los pigmentos de hojas del árbol flor de manita contra cepas ATCC Gram positivas y negativas.
- Determinar el efecto anti-diarreico del extracto crudo, de la fracción sin pigmentos y los pigmentos de las hojas del árbol flor de manita.
- Determinar la actividad del extracto crudo y de la fracción proteica en comparación con un anti-diarreico comercial.
- Realizar un análisis estadístico.

## VI.- MATERIAL

- a) Extracto crudo (EC) y Fracción sin Pigmentos (FSP) de las hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).
- b) Ratas Wistar de 300 a 400 gr mantenidas con alimento y agua *ad libitum*.
- c) Reactivos de grado analítico

## VII.- METODOS

### ▪ Obtención de Extracto Crudo (EC)

Para la obtención del extracto crudo se utilizaron 150 gr de hojas secas del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), se homogenizaron con agua destilada en mortero, posteriormente se filtró, seguido a esto se centrifugó a 2500 rpm por 15 min. Al sobrenadante se le llamó extracto crudo.

### ▪ Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos

La extracción de los pigmentos presentes en las hojas de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) se llevó a cabo mediante la inmersión de las hojas en los solventes, haciéndose numerosos lavados hasta obtener las hojas sin pigmentos. Los pigmentos extraídos fueron concentrados mediante baño María, para evaporar el exceso de solventes ya que para probarlos *in-vitro* e *in-vivo* se usaron de manera concentrada (1mg/mL).

▪ **Obtención de la Fracción sin Pigmentos (FSP)**

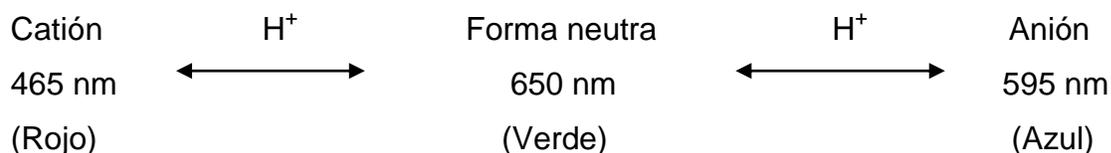
Para la obtención de la fracción sin pigmentos se pesaron 200 gr de hojas secas del árbol de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) sin pigmentos, se homogenizaron con agua destilada en mortero, posteriormente se filtró, seguido a esto se centrifugó a 2500 rpm por 15 min. Al sobrenadante se le llamó fracción sin pigmentos.

▪ **Cuantificación de Proteínas**

El método utilizado para la cuantificación de proteínas fue el método de Bradford. El método consiste en la unión del colorante Azul brillante de Coomasie G-250 a una proteína desconocida en solución ácida esto hace que el máximo de absorción del colorante cambie de 465 nm a 595 nm y la compara contra diferentes cantidades de una proteína estándar, usualmente albúmina de suero bovino (BSA) (Voet y col., 2009). El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción a 595 nm (Giraldo y col., 2010).

El colorante existe en 3 formas: catiónica (rojo), neutra (verde) y aniónica (azul).

Bajo condiciones ácidas, el colorante es principalmente rojo por partida doble protonada en forma catónica. Sin embargo, cuando el colorante se une a la proteína, se convierte en una forma no protonada azul (<http://kirschner.med.harvard.edu>).



En este ensayo se realizó una curva patrón utilizando BSA, Buffer PBS (0.1 M, pH 7.5) y reactivo de Bradford; se midió a una longitud de onda de 595 nm y la concentración de proteínas presente en las muestras problema se obtienen interpolando las absorbancias obtenidas en la curva patrón.

- **Método de Extracción de Lípidos**

Pueden utilizarse diferentes métodos con disolventes orgánicos para realizar la extracción de lípidos de una muestra; el más utilizado es el método de Folch, en el cual se realiza una extracción con cloroformo: metanol (2:1, V: V). El metanol rompe los enlaces que se dan entre los lípidos y las proteínas de las membranas e inhibe la acción de las enzimas lipasas (desnaturalizándolas), mientras que el cloroformo permite la disolución de los lípidos (Roca y col., 2003). Este método fue utilizado para la extracción de los lípidos presentes tanto en el EC como en la FSP; además de ser utilizado para obtener la fracción orgánica (F1) y la fracción proteica (F2) del EC y FSP para determinar de igual manera su actividad anti bacteriana *in-vitro*.

- **Diálisis**

La diálisis es un proceso que separa a las moléculas según su tamaño mediante el uso de membranas semipermeables que puede ser de celofán (acetato de celulosa) que es el material de diálisis más utilizado, aunque también se emplean otros materiales como celulosa y colodión; dichas membranas cuentan con poros de dimensiones menores que las macromoléculas (Voet y col., 2004). La diálisis se basa en la imposibilidad de que las proteínas atraviesen los poros de una membrana semipermeable debido a su gran tamaño en tanto que las moléculas con un peso molecular más bajo se distribuyen, hasta llegar a un equilibrio de concentraciones, entre ambos lados de la membrana. Si se modifica varias veces la solución externa las condiciones en el interior de una bolsa o tubo de diálisis, por ejemplo, las concentraciones de las sales, el pH, etc. Serán iguales a las de la solución circulante (Koolman J, Röhm H, 2004).

Para la diálisis de las muestras se usaron membranas Spectra/Por 3 MWCO 3,500. Spectrumlabs 3233006.

- **Liofilización**

La liofilización es un proceso de estabilización en el cual el material primero se congela y se concentra el solvente, comúnmente el agua, reduciéndolo mediante sublimación y desorción, a niveles que no sostendrán más el crecimiento biológico o las reacciones químicas. Es el más noble proceso de conservación de productos biológicos conocidos, porque reúne los dos métodos más fiables de conservación: la congelación y la deshidratación (Ramírez, 2006; Montoya, 2008).

- **Preparación de medios de cultivo**

Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes en los que crecen y se multiplican los microorganismos en el laboratorio, con el objeto de aislar diferentes especies bacterianas, proceder a su identificación y llevar a cabo una serie de estudios complementarios. Los medios líquidos contienen nutrientes, a los cuales se les adiciona una sustancia capaz de mantener el pH adecuado. Entre los más empleados están en caldo nutritivo y el caldo peptona (Montoya, 2008). A un medio de cultivo líquido puede añadirse una sustancia gelificante, éste debidamente esterilizado, se vierte en una caja de Petri, este tipo de medio ofrecen la posibilidad de obtener colonias aisladas (Prats, 2007; Montoya, 2008). Para realizar las pruebas *in-vitro* se utilizó medio Muller-Hilton, tanto medio líquido como medio sólido, llevándose el agar diluido en agua hasta ebullición, posteriormente se esterilizó en autoclave a una presión de 15 lb/15 min. Terminado este procedimiento el medio de cultivo líquido y sólido es vaciado a tubos de vidrio y placas Petri, respectivamente.

- **Estandarización del antibiótico**

Como control positivo para el ensayo se eligió gentamicina de 80 mg/2 mL y levofloxacino para bacterias Gram (-); éste último se uso en presentación de tabletas de 750 mg que se pulverizaron y re-suspendieron en 5 mL de agua estéril

(Gil, 2012). También se eligieron discos comerciales de penicilina para bacterias Gram (+), los cuales son de la marca BD BBL que cuentan con una concentración de 10 µg, dándonos así un halo de inhibición de 5 mm.

- **Escala de McFarland**

Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. Consiste en varios tubos de vidrio herméticamente cerrados que contienen (1% de Ba Cl<sub>2</sub> más cantidades crecientes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%); por lo tanto, en cada tubo se origina un precipitado de Ba SO<sub>4</sub>, origen de la turbidez (<http://www.biologia.edu>).

En caldo estéril se siembran de 4 a 5 colonias del microorganismo problema, dejar crecer; dado su crecimiento medir su absorbancia, la cual debe de estar entre

0.08 y 1 a una longitud de onda de 630 nm. Cuando la absorbancia de la muestra se encuentra en este rango se tiene un valor de 0,5 en la escala de McFarland que equivale a  $1 \times 10^8$  UFC/ml (<http://es.scribd.com>).

La escala fue empleada para tener un número de UFC adecuado para la correcta visualización de la actividad anti bacteriana, tanto de los antibióticos empleados como control positivo así como de las muestras problema.

- **Actividad Antimicrobiana (difusión en disco)**

Es un procedimiento que se utiliza con frecuencia para estudiar la acción antimicrobiana. El método consiste en preparar una caja Petri con un medio de cultivo apropiado para el óptimo crecimiento del microorganismo seleccionado. El microorganismo es sembrado en el medio y se colocan discos de papel filtro con el agente a probar. Durante la incubación, el agente se difunde desde el disco de papel filtro al agar; al finalizar el periodo de incubación se observan una serie de halos de inhibición del crecimiento microbiano alrededor de los discos de papel, de diferentes diámetros. Este método es muy rutinario para comprobar la sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos patógenos y se conoce con el nombre de antibiograma (Montoya, 2008).

Para realizar la prueba se elaboró medio de cultivo Muller-Hilton en el cual se cultivaron los microorganismos de prueba, que fueron:

*Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Se utilizaron las diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 (o hasta lograr la dilución mínima que genere una respuesta) de cada una de las muestras a probar; se usaron gentamicina en diluciones 1:128 y 1:256; sensidiscos de antibiótico penicilina con una concentración de 5 µg/disco; levofloxacino a una dilución de 1:8192 como controles positivos y buffer PBS como control negativo (Gil, 2012). A continuación se impregnaron los discos de papel filtro estériles con una capacidad de 25 µL de cada uno de los extractos a probar y se colocaron sobre el agar de tal manera que no se interpongan las zonas de inhibición. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Una vez terminado el periodo de incubación, se midió la zona de inhibición producida por las muestras y los controles. Cada extracto fue probado por triplicado (Lin y col, 2002). Se reportan los resultados en mm.

#### ▪ **Determinación de la actividad anti-diarreica**

La determinación de la actividad anti-diarreica se realizó empleando procedimientos *in-vivo* utilizando ratas macho Wistar de 300 a 400 gr de peso, basándose en el método de Edwin y col., 2007 (con modificaciones). Antes de comenzar las pruebas, los animales se mantuvieron en ayuno durante 16 hrs, dejándolos únicamente con agua *ad libitum* (Escobar y col., 2010).

Se dividieron las ratas en 10 grupos (n=6). Los primeros dos grupos fueron los controles:

- Grupo I control positivo: tratado únicamente con el vehículo, solución salina 0.9 % (vía oral).
- Grupo II control negativo: tratado con loperamida 3 mg/Kg (vía oral).

Los grupos III, IV, V fueron tratados con EC en dosis de 200 mg/Kg, 400 mg/Kg, 800 mg/Kg (vía oral), respectivamente.

A los grupos VI, VII, VIII se les administró FSP en dosis de 200 mg/Kg, 400 mg/Kg, 800 mg/Kg (vía oral), respectivamente.

Los grupos IX, X fueron tratados con pigmentos acetónicos y pigmentos alcohólicos de las hojas del árbol flor de manita, vía oral, a una dosis de 1 mg/mL, respectivamente.

Después de 30 min de administrado el tratamiento, se le suministró a todos los animales 3 mL de aceite de ricino por vía oral mediante una cánula de alimentación oral 16G, se pesó la materia fecal durante 6 hrs (Edwin y col., 2007).

Para evaluar el tiempo transcurrido entre la administración del agente inductor y la excreción de las primeras heces diarreicas; se determinó la cantidad en gramos de heces diarreicas excretadas durante las siguientes 6 hrs tras la inducción del proceso diarreico, siguiendo el metodo de Escobar y col., 2010; para esto, los animales se distribuyeron en jaulas de manera individual a las cuales se les colocó en el fondo un papel estraza que fue sustituido cada hora de ensayo, de cada papel se contaron, se observó su consistencia y pesaron las heces que estuvieran presentes.

- **Determinación de la inhibición de la motilidad intestinal**

El efecto inhibidor sobre la motilidad digestiva se lleva a cabo sobre todo el aparato gastrointestinal; incrementando el tono y reducen la motilidad del antro gástrico y del píloro, provocando un retraso del vaciamiento del estómago; aumentan el tono y las contracciones no propulsivas en intestino delgado y colon, disminuyendo la actividad peristáltica y, por lo tanto, dificultando el avance de la masa fecal, mejorando la consistencia en los pacientes con diarrea (Lorenzo y col., 2009). Para esta prueba se utilizaron ratas machos Wistar de 400 a 450 gr de peso. Antes de comenzar la prueba los animales se mantuvieron en ayuno por 18 hrs, dejándolos únicamente con agua *ad libitum*.

Se dividieron las ratas en 7 grupos (n=6). Los primeros dos grupos fueron los controles, el resto de los grupos fueron tratados con los extractos de las hojas del árbol flor de manita; la administración de las soluciones control así como de la administración de las muestras fue por vía oral usando una cánula de alimentación oral 16G, los grupos fueron divididos de la siguiente manera:

- Grupo I control positivo: tratado con solución de metilcelulosa al 2%.
- Grupo II control negativo: tratado con loperamida 3 mg/Kg.
- Grupos III, IV: tratados con EC 200 mg/Kg, EC 400 mg/Kg, respectivamente.
- Grupos V, VI: tratados con FSP 200 mg/Kg, FSP 400 mg/Kg, respectivamente.
- Grupo VII: tratado con PA 1 mg/Kg.

Se le administro a los animales 1 mL de muestra por cada 100 gr de peso corporal. Treinta minutos después, en el mismo orden en que se administró las soluciones control y las muestras se administran a todos los animales 3 mL de preparado de carbón activado (el cual es una mezcla de carbón activado al 5% con goma acacia al 5%, se pesan 5 gr de cada uno, se mezclan y se diluyen en 200 mL de solución de metilcelulosa al 2%). A los 30 min de administrado el preparado de carbón activado se sacrifican a los animales en base a la NOM-062-ZOO-1999 ([www.fmvz.unam.mx](http://www.fmvz.unam.mx)). Tomar de cada animal el intestino delgado con cuidado y medir la longitud total del intestino y la distancia recorrida por el preparado de carbón activado (Lin, 2002, Sánchez y col., 2011).

#### ▪ Análisis Estadístico

La prueba t-student se puede usar para comparar diferencias entre los promedios de dos grupos u observaciones (independientes), o para comparar los promedios de dos observaciones realizadas a una misma persona. La prueba ANOVA es un procedimiento que permite comparar diferencias entre muchos grupos (Moncada, 2005).

A los valores obtenidos en cada parámetro analizado se les calculó media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar (DE).

Se realizó la prueba de Dunnett, prueba de Tukey; así como un análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor; las diferencias  $p < 0.05$  se consideraron significativas.



En la tabla 3, se muestra la CIM del EC de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, que fue de 0.09 mg/mL, así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 3.- Valor CIM de EC dilución 1:4 contra *Escherichia coli* ATCC 27543**

<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 27543</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	5 ± 0	0.3125
Buffer PBS (control -)	0 ± 0	
Concentración 370 µg/mL(1:1)	1 ± 0	
Concentración 180 µg/mL(1:2)	1 ± 0	
Concentración 90 µg/mL (1:4)	1 ± 1.4	0.09
Concentración 45 µg/mL (1:8)	0 ± 0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 9, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. El EC no presenta actividad contra la bacteria; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1: 256.



**Fig.9.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

En la tabla 4, se muestran los resultados de la CIM del EC de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, el EC no tuvo actividad frente a esta bacteria, además se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 4.- Valor CIM de EC contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	6 ± 1	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 370 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 180 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 90 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 45 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
 CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 10, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.



**Fig.10.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

En la tabla 5, se muestra la CIM del EC de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, que fue de 0.04 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 5.- Valor CIM de EC dilución 1:8 contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	6 ± 1	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 370 µg/mL (1:1)	1.5 ± 0.7	
Concentración 180 µg/mL (1:2)	1 ± 0	
Concentración 90 µg/mL (1:4)	1 ± 0	
Concentración 45 µg/mL (1:8)	1 ± 0	0.04

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 11, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El extracto no presenta actividad contra esta bacteria; notándose la sensibilidad al antibiótico penicilina.



**Fig.11.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

En la tabla 6, se muestra la CIM del EC de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, el EC no presenta actividad contra la bacteria; en la tabla también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 6.- Valor CIM de EC contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	14 ± 7	0.1
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 370 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 180 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 90 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 45 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 12, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. El extracto presenta actividad contra esta bacteria hasta la dilución 1:1; notándose la resistencia al antibiótico penicilina.



**Fig.12.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.**

En la tabla 7, se muestra la CIM del EC de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, el EC presenta actividad contra la bacteria en la dilución 1:1.

Tabla 7.- Valor CIM de EC dilución 1 :1 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 370 µg/mL (1:1)	1 ± 1.4	0.37
Concentración 180 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 90 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 45 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 13 se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

La actividad se observa en la dilución 1:2 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución de 1:8192.



Fig.13.-Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la tabla 8, se muestra la CIM del EC de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, que fue de 0.18 mg/ml; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 8.- Valor CIM de EC dilución 1:2 contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.**

<b><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 25922</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacin 1:8192 (control +)	11 ± 4	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 370 µg/mL (1:1)	1 ± 0	
Concentración 180 µg/mL (1:2)	1 ± 0	0.18
Concentración 90 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 45 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes. CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

### **Extracto Crudo, Fracción Orgánica (EC F1)**

Para la obtención de una fracción enriquecida con proteínas se utilizó el método de Folch, con el cual se obtienen tres fracciones, una de esas fracciones contiene el cloroformo con los lípidos presentes en la muestra (esta fracción es desechada), las otras dos fracciones denominadas EC F1 y EC F2 contienen los compuestos orgánicos (algunas proteínas y pigmentos) y las proteínas (en su totalidad), respectivamente; siendo éstas caracterizadas, a continuación se describen los resultados de la actividad antibacteriana *in-vitro* que presentan.

Para conocer la actividad antibacteriana del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita, éste fue probado *in-vitro* contra las cepas de *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La fracción F1 del EC fue obtenida mediante el método de Folch.

En la figura 14, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543. La actividad se observa en la dilución 1:4 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1: 256.

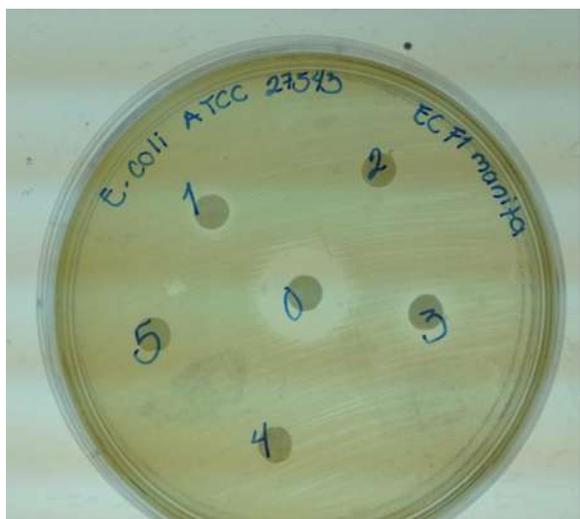


Fig.14.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

En la tabla 9, se muestra la CIM del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, que fue de 0.136 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 9.- Valor CIM del EC F1 dilución 1:4 contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	5 ± 0	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 136 µg/mL (1:1)	1 ± 0	0.136
Concentración 68 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 34 µg/mL (1:4)	1±0	0.034
Concentración 17 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 15, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad se observa en la dilución 1:1 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.

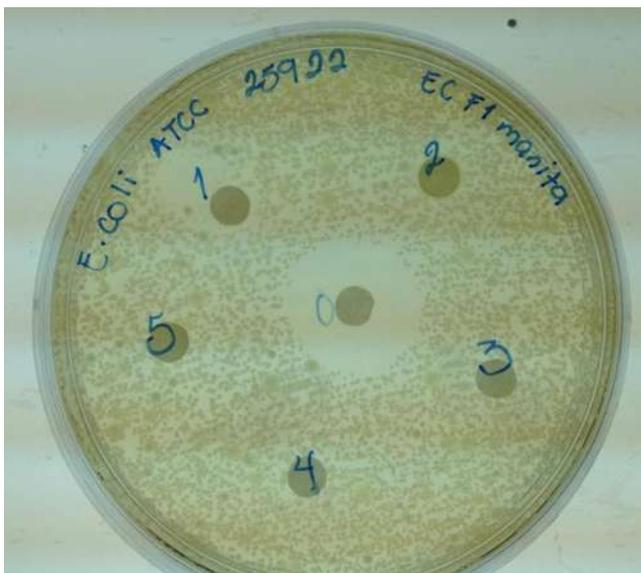


Fig.15.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

En la tabla 10, se muestra la CIM del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, que fue de 0.136 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 10.- Valor CIM del EC F1 dilución 1:1 contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	6 ± 1	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 136 µg/ml (1:1)	1.5 ± 0.7	0.136
Concentración 68 µg/ml (1:2)	0	
Concentración 34 µg/ml (1:4)	0	
Concentración 17 µg/ml (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 16, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.

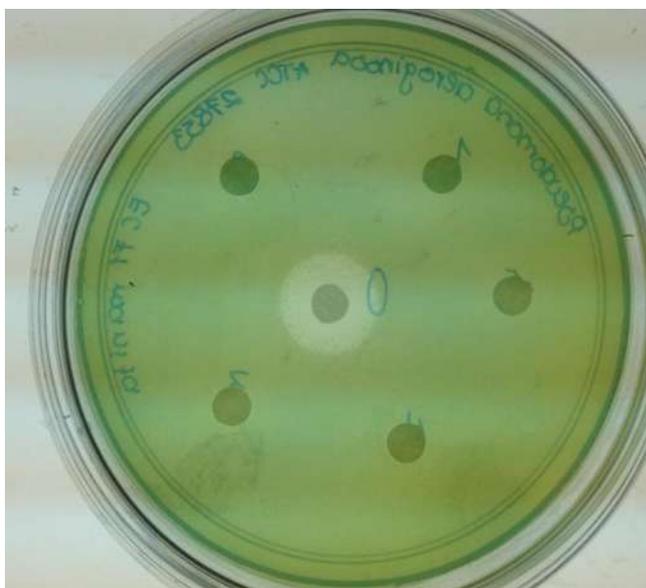


Fig.16.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la tabla 11, se muestra la CIM del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, además se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 11.- Valor CIM de EC F1 dilución 1:1 contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	5 ± 0	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 136 µg/mL (1:1)	1 ± 1.4	0.136
Concentración 68 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 34 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 17 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 17, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El EC F1 no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la sensibilidad al antibiótico penicilina.



**Fig.17.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

En la tabla 12, se muestra la CIM del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, el EC F1 no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 12.- Valor CIM del EC F1 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	11 ± 9	0.1
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 136 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 68 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 34 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 17 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 18, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. El EC F1 no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la resistencia al antibiótico penicilina.



Fig.18.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

En la tabla 13, se muestra la CIM del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, el EC F1 no presenta actividad contra esta bacteria, así mismo el microorganismo es resistente al antibiótico penicilina.

Tabla 13.- Valor CIM de EC F1 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 136 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 68 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 34 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 17 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 19, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La actividad se observa en la dilución 1:1 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución 1:8192.



Fig.19.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la tabla 14, se muestra la CIM del EC F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, el EC F1 presenta actividad contra esta bacteria en la dilución 1:1; también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 14.- Valor CIM de EC F1 dilución 1:1 contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

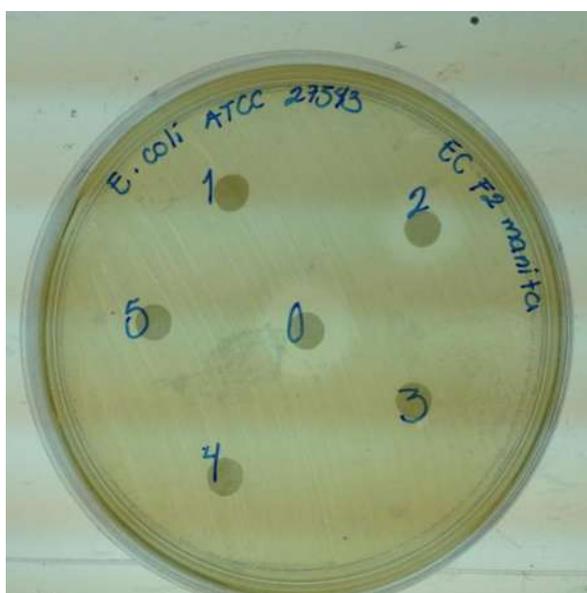
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacino 1:8192 (control +)	9.5 ± 0.5	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 136 µg/mL (1:1)	2.5 ± 0.7	0.136
Concentración 68 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 34 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 17 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes  
 CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

**Extracto Crudo, Fracción Proteíca (EC F2)**

Para conocer la actividad antibacteriana del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita, éste fue probado *in-vitro* contra las cepas de *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La fracción F2 del EC fue obtenida mediante el método de Folch.

En la figura 20, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543. La actividad se observa en la dilución 1:2 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1: 256.



**Fig.20.-** Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

En la tabla 15, se muestra la CIM del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, que fue de 0.09 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 15.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	4.5 ± 0.7	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 180 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 90 µg/mL (1:2)	1 ± 0	0.09
Concentración 45 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 22.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 21, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad se observa en la dilución 1:2 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.

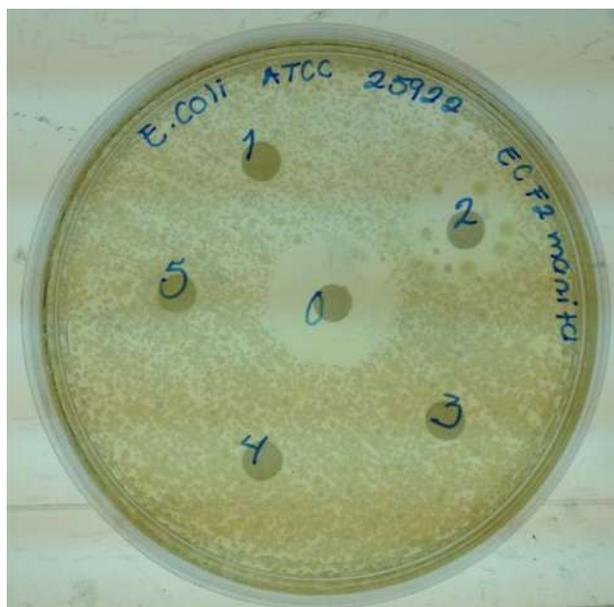


Fig. 21.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

En la tabla 16, se muestra la CIM del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, que fue de 0.09 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 16.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	8.5 ± 4	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 180 µg/ml (1:1)	0	
Concentración 90 µg/ml (1:2)	3.5 ± 2	0.09
Concentración 45 µg/ml (1:4)	0	
Concentración 22.5 µg/ml (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
 CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 22, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La actividad se presenta en la dilución 1:2, además se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.



**Fig.22.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

En la tabla 17, se muestra la CIM del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, que fue de 0.09 mg/mL; además se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 17.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	5 ± 0	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 180 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 90 µg/mL (1:2)	3 ± 0	0.09
Concentración 45 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 22.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 23, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El EC F2 no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la sensibilidad al antibiótico penicilina.

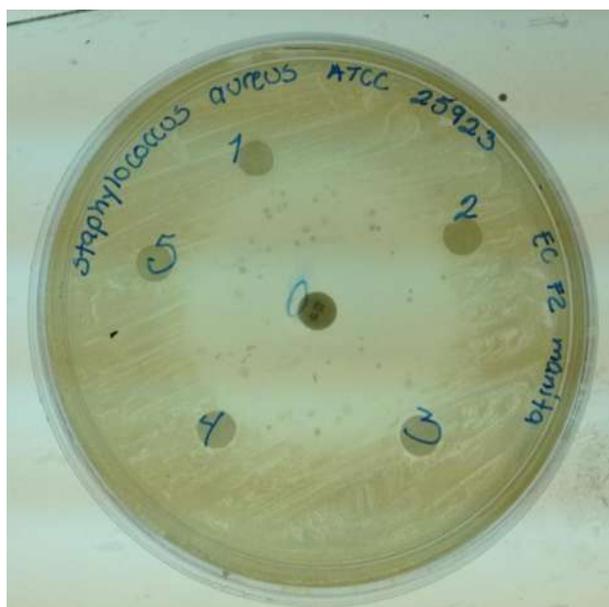


Fig. 23.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla 18, se muestra la CIM del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, el EC F2 no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 18.- Valor CIM de EC F2 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	11 ± 9	0.1
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 180 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 90 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 45 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 22.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 24, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. El EC F2 no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la resistencia al antibiótico penicilina.

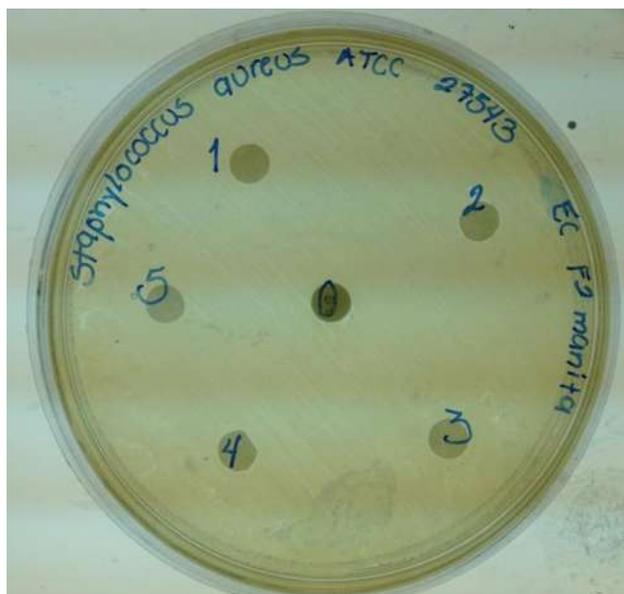


Fig.24.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

En la tabla 19, se muestra la CIM del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, el EC F2 no presenta actividad contra esta bacteria, así mismo el microorganismo es resistente al antibiótico penicilina.

Tabla 19.- Valor CIM de EC F2 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 180 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 90 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 45 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 22.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 25, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La actividad se observa en la dilución 1:2 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución 1:8192.

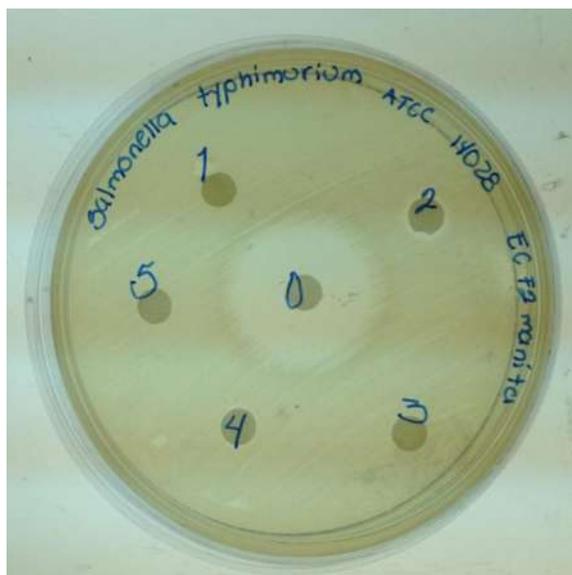


Fig.25.- Actividad antibacteriana *in-vitro* del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la tabla 20, se muestra la CIM del EC F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, que es de 0.09 mg/mL, también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 20.- Valor CIM de EC F2 dilución 1:2 contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.**

<b><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacino 1:8192 (control +)	8 ± 0	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 180 µg/mL (1:1)	1 ± 1.4	
Concentración 90 µg/mL (1:2)	2 ± 1.4	0.09
Concentración 45 µg/mL (1:4)	1 ± 1.4	
Concentración 22.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

### **Fracción sin Pigmentos (FSP)**

Con el objeto de comprobar que la fracción sin pigmentos conserva la actividad antibacteriana se analizaron *in-vitro* contra las cepas *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la figura 26, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256



**Fig.26.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543.**

En la tabla 21, se muestra la CIM de la FSP de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, que fue de 0.039 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 21.- Valor CIM de la FSP dilución 1:8 contra *Escherichia coli* ATCC 27543.**

<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	4 ± 0.5	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 315 µg/mL (1:1)	1 ± 1.4	
Concentración 157 µg/mL (1:2)	1 ± 1.4	
Concentración 78 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 39 µg/mL (1:8)	2 ± 1.4	0.39

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 27, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad se observa en la dilución 1:1 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.



**Fig.27.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

En la tabla 22, se muestra la CIM de la FSP de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, que fue de 0.315 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 22.- Valor CIM de la FSP dilución 1:1 contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	6 ± 1	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 315 µg/ml (1:1)	1.5 ± 0.7	0.315
Concentración 157 µg/ml (1:2)	0	
Concentración 78 µg/ml (1:4)	0	
Concentración 39 µg/ml (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 28, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La FSP no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.

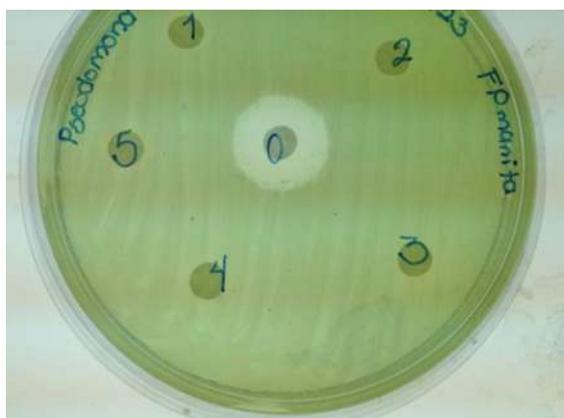


Fig.28.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la tabla 23, se muestra la CIM de la FSP de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la FSP no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 23.- Valor CIM de la FSP contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	4 ± 0.5	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 315 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 157 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 78 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 39 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 29, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La FSP no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la sensibilidad al antibiótico penicilina.



Fig.29.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla 24, se muestra la CIM de la FSP de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la FSP no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 24.- Valor CIM de la FSP contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	14 ± 7	0.1
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 315 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 157 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 78 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 39 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 30, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. La FSP no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la resistencia al antibiótico penicilina.



**Fig.30.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

En la tabla 25, se muestra la CIM de la FSP de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, la FSP no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestran el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 25.- Valor CIM de la FSP contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 315 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 157 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 78 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 39 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 31, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución 1:8192.

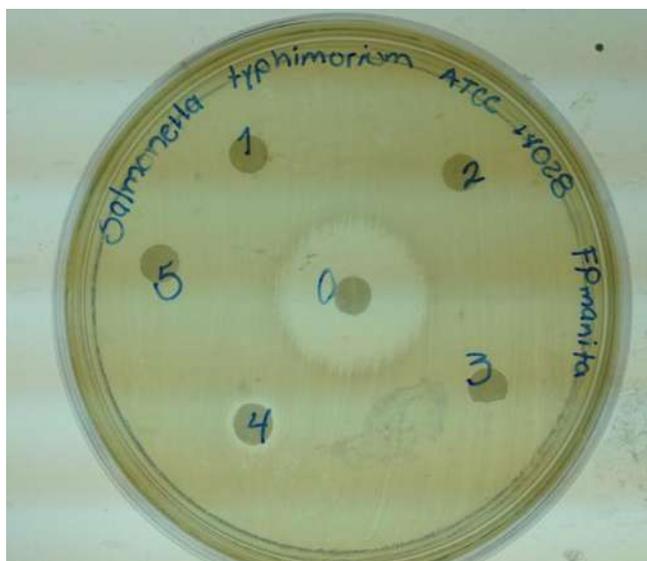


Fig.31.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la tabla 26, se muestra la CIM de la FSP de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, la FSP presenta actividad contra esta bacteria hasta la dilución 1:8; también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 26.- Valor CIM de la FSP dilución 1:8 contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacin 1:8192 (control +)	10 ± 4	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 315 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 157 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 78 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 39 µg/mL (1:8)	1.5 ± 0.7	0.039

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

### Fracción sin Pigmentos fracción 1 (FSP F1)

La fracción sin pigmentos fracción 1 (FSP F1) de las hojas del árbol flor de manita fue probada *in-vitro* contra las cepas *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la figura 32, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543. La actividad se observa en la dilución 1:4 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.



Fig.32.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

En la tabla 27, se muestra la CIM de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, que fue de 0.025 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 27.- Valor CIM de la FSP F1 dilución 1:4 contra *Escherichia coli* ATCC 27543.**

<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	5 ± 1	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	1 ± 0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	1 ± 0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	2.5 ± 3	0.025
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 33, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad se observa en la dilución 1:1 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.



**Fig.33.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

En la tabla 28, se muestra la CIM de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, que fue de 0.10 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

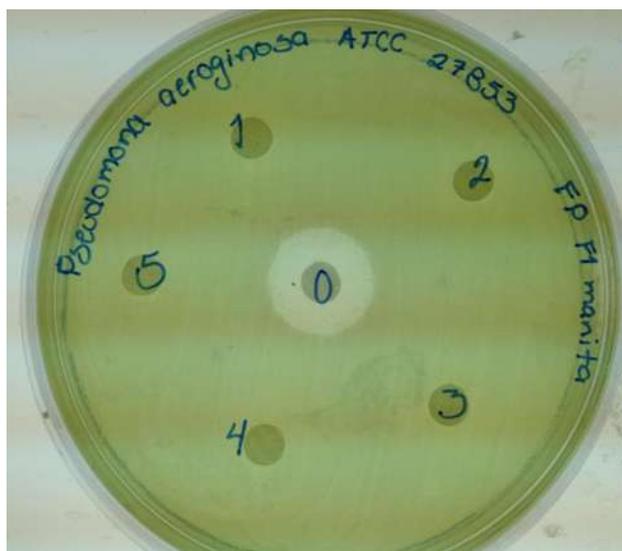
**Tabla 28.- Valor CIM de la FSP F1 dilución 1:1 contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	6 ± 1	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/ml (1:1)	2 ± 2.8	0.10
Concentración 50 µg/ml (1:2)	0	
Concentración 25 µg/ml (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/ml (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 34, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La FSP F1 no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.



**Fig.34.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

En la tabla 29, se muestra la CIM de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la FSP F1 no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

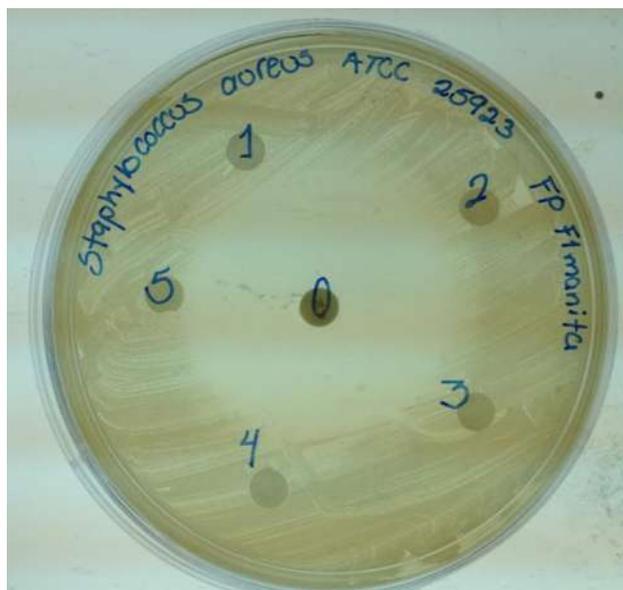
**Tabla 29.- Valor CIM de la FSP F1 contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.**

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	5 ± 0	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima

En la figura 35, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La FSP no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la sensibilidad al antibiótico penicilina.



**Fig.35.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

En la tabla 30, se muestra la CIM de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la FSP F1 no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

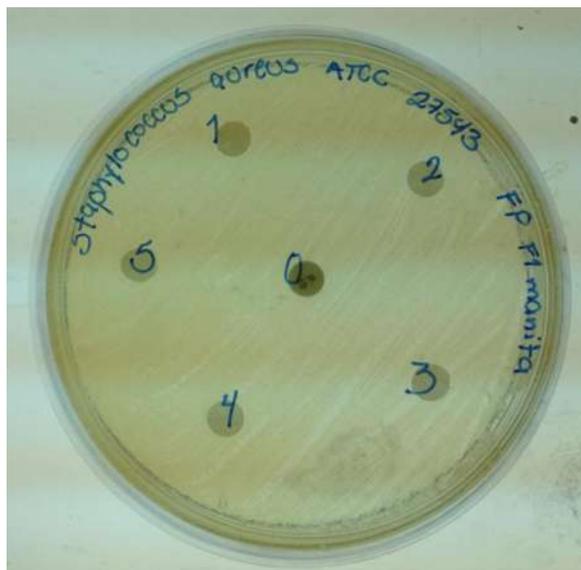
**Tabla 30.- Valor CIM de la FSP F1 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	13 ± 2	0.1
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 36, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. La FSP F1 no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la resistencia al antibiótico penicilina.



**Fig.36.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.**

En la tabla 31, se muestra la CIM de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, la FSP F1 no presenta actividad contra esta bacteria; mostrando resistencia al antibiótico penicilina.

**Tabla 31.- Valor CIM de la FSP F1 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.**

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 37, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La FSP F1 no presenta actividad contra este microorganismo; notándose la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución 1:8192.



**Fig.37.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.**

En la tabla 32, se muestra la CIM de la FSP F1 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, la FSP F1 no presenta actividad contra esta bacteria; se muestra además el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 32.- Valor CIM de la FSP F1 contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.**

<b><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacino 1:8192 (control +)	8.5 ± 0.5	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

### **Fracción sin Pigmentos fracción 2 (FSP F2)**

La fracción sin pigmentos fracción 2 (FSP F2) de las hojas del árbol flor de manita fue probada in-vitro contra las cepas *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la figura 38, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.



Fig.38.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

En la tabla 33, se muestra la CIM de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, que fue de 0.040 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 33.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:8 contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	6.5 ± 0.7	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 320 µg/mL (1:1)	1.5 ± 0.7	
Concentración 160 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 80 µg/mL (1:4)	1.5 ± 2	
Concentración 40 µg/mL (1:8)	2 ± 2.8	0.040

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 39, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.



Fig.39.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

En la tabla 34, se muestra la CIM de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, que fue de 0.040 mg/mL; así como el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 34.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:8 contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	7 ± 0	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 320 µg/ml (1:1)	3 ± 1.4	
Concentración 160 µg/ml (1:2)	0	
Concentración 80 µg/ml (1:4)	0	
Concentración 40 µg/ml (1:8)	4 ± 1.4	0.040

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 40, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La FSP F2 presenta actividad contra esta bacteria en la dilución 1:1; se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.

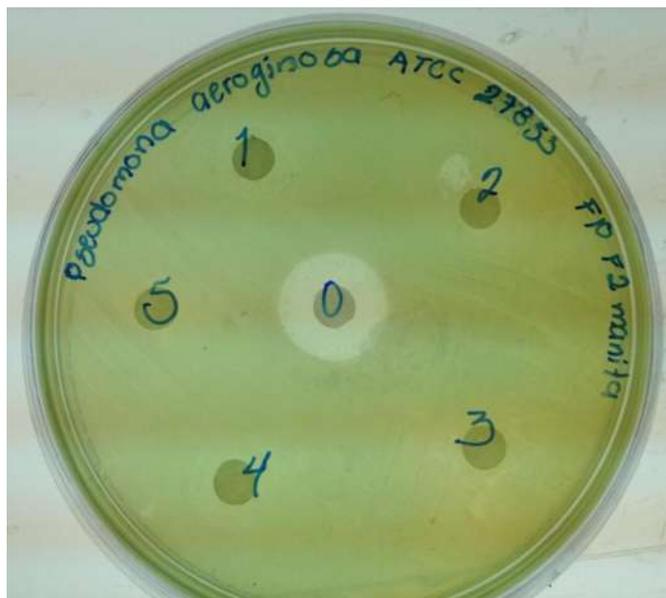


Fig.40.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la tabla 35, se muestra la CIM de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, que es de 0.320 mg/mL; se muestra también el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 35.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:1 contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	5 ± 0	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 320 µg/mL (1:1)	3.5 ± 0.7	0.320
Concentración 160 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 80 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 40 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 41, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La FSP F2 no presenta actividad contra esta bacteria; más sin embargo se nota la sensibilidad al antibiótico penicilina.

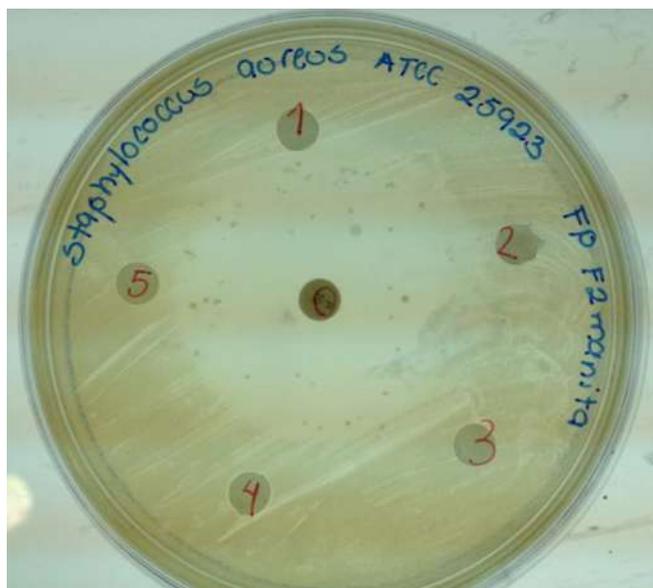


Fig.41.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla 36, se muestra la CIM de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la FSP F2 no presenta actividad contra esta bacteria; pero se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 36.- Valor CIM de la FSP F2 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	13 ± 2	0.1
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 320 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 160 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 80 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 40 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 42, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. La FSP F2 presenta actividad contra esta bacteria en la dilución 1:8; además se nota la resistencia al antibiótico penicilina.

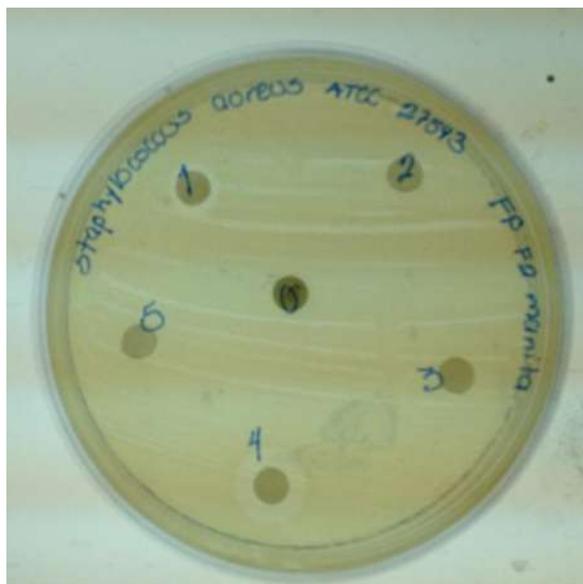


Fig.42.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

En la tabla 37, se muestra la CIM de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, que es de 0.040 mg/mL; el microorganismo muestra resistencia al antibiótico penicilina.

Tabla 37.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:8 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 320 µg/mL (1:1)	2 ± 1.4	
Concentración 160 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 80 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 40 µg/mL (1:8)	2.5 ± 0.7	0.040

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 43, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La FSP F2 presenta actividad contra este microorganismo hasta la dilución 1:8; notándose la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución 1:8192.

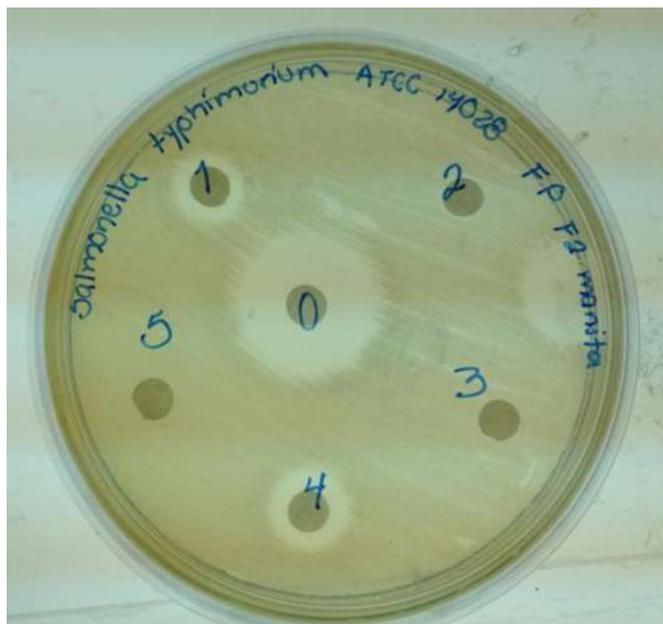


Fig.43.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la tabla 38, se muestra la CIM de la FSP F2 de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, que fue de 0.040 mg/mL; se muestra además el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 38.- Valor CIM de la FSP F2 dilución 1:8 contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacino 1:8192 (control +)	7.5 ± 0.7	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 320 µg/mL (1:1)	2 ± 1.4	
Concentración 160 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 80 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 40 µg/mL (1:8)	4 ± 0	0.040

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

### Pigmentos acetónicos (PA)

Los pigmentos acetónicos de las hojas del árbol flor de manita fueron también probados de manera *in-vitro* contra las cepas de *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas auroginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la figura 44, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de los pigmentos acetónicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543. La actividad se observa en la dilución 1:4 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.



Fig.44. Actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

En la tabla 39, se muestra la CIM de los PA de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, los PA presenta actividad contra esta bacteria hasta la dilución 1:4; también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 39.- Valor CIM de PA dilución 1:4 contra *Escherichia coli* ATCC 27543.**

<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	5 ± 0	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	1 ± 1.4	0.25
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 45, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de los pigmentos acetónicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina 1:256.



**Fig. 45.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de los pigmentos acetónicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

En la tabla 40, se muestra la CIM de los PA de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, los PA presenta actividad contra esta bacteria hasta la dilución 1:8; también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 40.- Valor CIM de PA dilución 1:8 contra *Escherichia coli* ATCC 25922.**

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	5 ± 0	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	2 ± 2.8	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	1.5 ± 2.1	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	1 ± 1.4	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	1.5 ± 0.7	0.125

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 46, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.



**Fig.46.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

En la tabla 41, se muestra la CIM de los PA de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, los PA presenta actividad contra esta bacteria en la dilución 1:1; también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 41.- Valor CIM de PA dilución 1:1 contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	5 ± 0	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	2.5 ± 0.7	1
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

Fig.47.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La actividad se observa en la dilución 1:8 de la muestra; notándose la sensibilidad al antibiótico penicilina.



**Fig.47.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

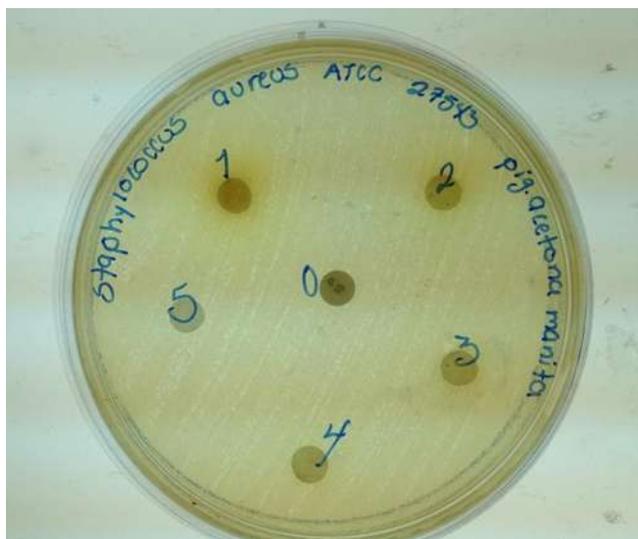
En la tabla 42, se muestra la CIM de los PA de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, los PA presenta actividad contra esta bacteria en la dilución 1:8; también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 42.- Valor CIM de PA dilución 1:8 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	5 ± 0	5
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	4.5 ± 0.7	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	3.5 ± 0.7	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	2 ± 0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	1 ± 0	0.125

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 48, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. La actividad se observa en la dilución 1:1 de la muestra; notándose la resistencia al antibiótico penicilina.



**Fig.48.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.**

En la tabla 43, se muestra la CIM de los PA de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, los PA presenta actividad contra esta bacteria en la dilución 1:1; también se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 43.- Valor CIM de PA dilución 1:1 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.**

<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	1 ± 1.4	1
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 49, se muestra la actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Los PA no presentan actividad *in-vitro* contra esta bacteria; notándose la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución de 1:8192.



**Fig.49.- Actividad antibacteriana *in-vitro* de los PA de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.**

En la tabla 44, se muestra la CIM de los PA de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, los PA no presentan actividad contra esta bacteria; pero en la tabla se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

**Tabla 44.- Valor CIM de PA contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.**

<b><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028</b>	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacino 1:8192 (control +)	5 ± 0	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/ml (1:1)	0	
Concentración 50 µg/ml (1:2)	0	
Concentración 25 µg/ml (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/ml (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

### **Pigmentos Etanólicos (PE)**

Los pigmentos etanólicos de las hojas del árbol flor de manita no presentaron actividad *in-vitro* contra ninguna de las cepas ATCC usadas en el ensayo.

En la figura 50, se muestra el antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543. No se observa actividad en ninguna de las diluciones. Se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.

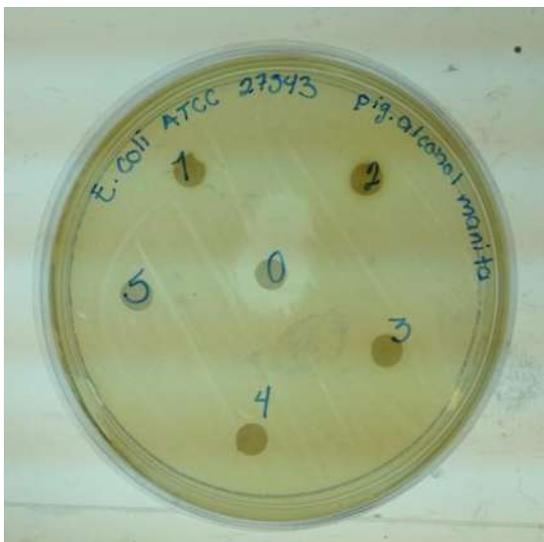


Fig.50.- antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

En la tabla 45, se muestra la CIM de los PE de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 27543, los PE no presentan actividad contra esta bacteria; pero en la tabla se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 45.- Valor CIM de PE contra *Escherichia coli* ATCC 27543.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	5 ± 0	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 51, se muestra el antibiograma de los pigmentos alcohólicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922. No se observa actividad en ninguna de las diluciones. Se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:256.

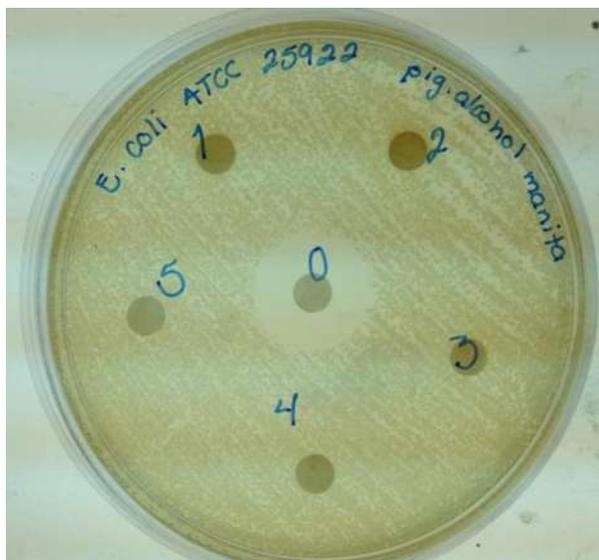


Fig.51.- Antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

En la tabla 46, se muestra la CIM de los PE de las hojas del árbol flor de manita frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, los PE no presentan actividad contra esta bacteria; pero en la tabla se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 46.- Valor CIM de PE contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:256 (control +)	7 ± 7	0.3125
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 52, se muestra el antibiograma de los pigmentos alcohólicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. No se observa actividad en ninguna de las diluciones. Se nota la sensibilidad al antibiótico gentamicina a una dilución 1:128.

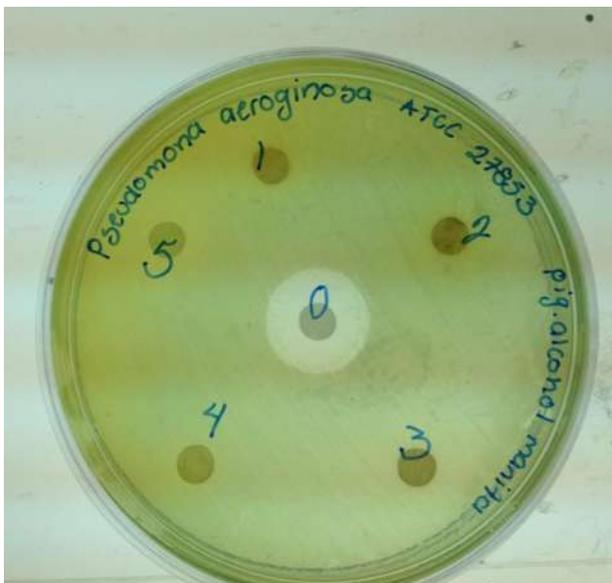


Fig.52.- antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la tabla 47, se muestra la CIM de los PE de las hojas del árbol flor de manita frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, los PE no presentan actividad contra esta bacteria; pero en la tabla se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 47.- Valor CIM de PE contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Gentamicina 1:128 (control +)	5 ± 7	0.625
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/ml (1:1)	0	
Concentración 50 µg/ml (1:2)	0	
Concentración 25 µg/ml (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/ml (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 53, se muestra el antibiograma de los pigmentos alcohólicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. No se observa actividad en ninguna de las diluciones. Se nota la sensibilidad al antibiótico levofloxacino a una dilución 1:8192.

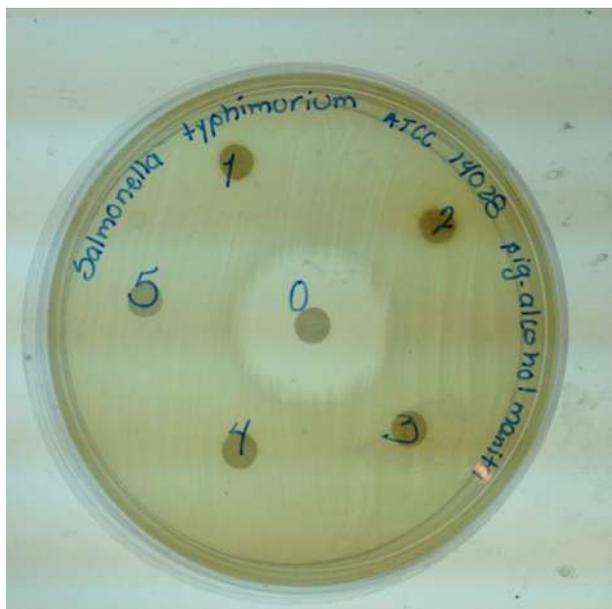


Fig.53.- antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

En la tabla 48, se muestra la CIM de los PE de las hojas del árbol flor de manita frente a *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, los PE no presentan actividad contra esta bacteria; pero en la tabla se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 48.- Valor CIM de PE contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Levofloxacino 1: 8192 (control +)	1 ± 0	0.1831
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 54, se muestra el antibiograma de los pigmentos alcohólicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. No se observa actividad en ninguna de las diluciones. Se nota la sensibilidad al antibiótico penicilina.



Fig.54.- antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla 49, se muestra la CIM de los PE de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 24923, los PE no presentan actividad contra esta bacteria; pero en la tabla se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 49.- Valor CIM de PE contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	1.8 ± 0.2	0.1
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.

CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la figura 55, se muestra el antibiograma de los pigmentos alcohólicos de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. No se observa actividad en ninguna de las diluciones. Se nota la resistencia al antibiótico penicilina.

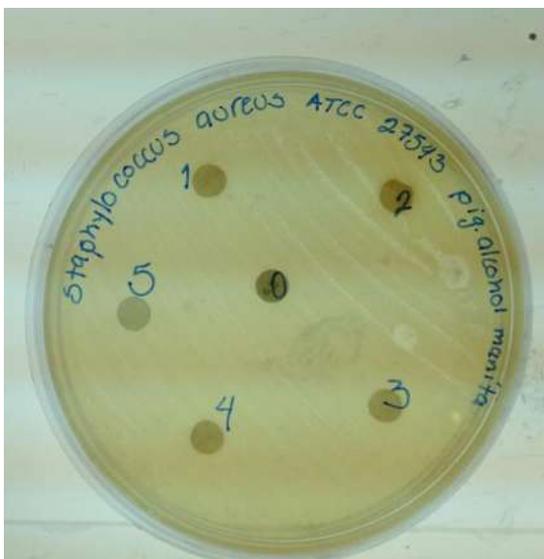


Fig.55.- antibiograma de los PE de las hojas del árbol flor de manita contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

En la tabla 50, se muestra la CIM de los PE de las hojas del árbol flor de manita frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, los PE no presentan actividad contra esta bacteria; pero en la tabla se muestra el valor del halo de inhibición del control positivo.

Tabla 50.- Valor CIM de PE contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	Halo inhibición (mm)	CIM (mg/mL)
Penicilina disco (control +)	Resistente	
Buffer PBS (control -)	0	
Concentración 100 µg/mL (1:1)	0	
Concentración 50 µg/mL (1:2)	0	
Concentración 25 µg/mL (1:4)	0	
Concentración 12.5 µg/mL (1:8)	0	

Los resultados representan la media ± DE (n=3) de ensayos independientes.  
CIM.- Concentración Inhibitoria Mínima.

En la tabla 51, se muestra una comparación de las CIM (mg/mL) de cada una de las bacterias usadas en el ensayo con cada uno de los extractos de las hojas del árbol flor de manita.

**Tabla 51.- Comparación de CIM entre extractos de las hojas del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).**

Bacteria	EC	EC F1	EC F2	FSP	FSP F1	FSP F2	PA	PE
<i>Escherichia coli</i> ATCC 27543	0.09	0.034	0.09	0.039	0.025	0.040	0.25	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0.136	0.09	0.315	0.10	0.040	0.125	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.04	0.136	0.09	0	0	0.320	0.5	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0	0.125	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	0.37	0	0	0	0	0.040	1	0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0.18	0.136	0.09	0.039	0	0.040	0	0

Los valores representan la concentración inhibitoria mínima (CIM) en mg/mL.

EC: Extracto crudo, EC F1: Extracto Crudo Fracción orgánica, EC F2: Extracto Crudo Fracción proteica, FSP: Fracción sin pigmentos, FSP F1: Fracción sin Pigmentos, Fracción orgánica, FSP F2: Fracción sin Pigmentos Fracción proteica, PA: Pigmentos acetona, PE: Pigmentos etanólicos.

## 2.- Determinación de la actividad anti-diarreica *in-vivo*

En la tabla 52 se muestran los resultados de los extractos de las hojas del árbol flor de manita sometidos a las pruebas para determinar sus efectos anti-diarreicos, en la tabla se muestra el peso de las heces después de las 6 hrs de ensayo que es un parámetro para evaluar la efectividad de los extractos, así como el porcentaje de protección de cada extracto.

**Tabla 52.- Actividad anti-diarreica de los extractos de las hojas del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).**

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Peso de las heces después	% de protección
-------	-------------	---------------	---------------------------	-----------------

			de 6 hrs (gr)	
I.-(control positivo)	<i>Loperamida</i>	3	3 ±0	92.59 %
II.-(control negativo)	<i>Solución Salina 9%</i>	----	27 ±6.2	----
III	<i>EC hojas del árbol flor de manita</i>	200	19.6±5.1	27.16 %
IV	<i>EC hojas del árbol flor de manita</i>	400	17.6 ±6.0	34.56 %
V	<i>EC hojas del árbol flor de manita</i>	800	11.6 ±2.5	56.79 %
VI	<i>FSP hojas del árbol flor de manita</i>	200	19 ±9.1	29.62 %
VII	<i>FSP hojas del árbol flor de manita</i>	400	15.3±2.5	43.20 %
VIII	<i>FSP hojas del árbol flor de manita</i>	800	13.3±4.9	50.61 %
IX	<i>PA hojas del árbol flor de manita</i>	1	4.3 ± 3.7	83.95 %
X	<i>PE hojas del árbol flor de manita</i>	1	17.3 ±15.3	35.80 %

Los valores se expresan como la media ± DE (n=6). EC: Extracto Crudo, FSP: Fracción sin Pigmentos, PA: Pigmentos Acetónicos, PE: Pigmentos Etanólicos.

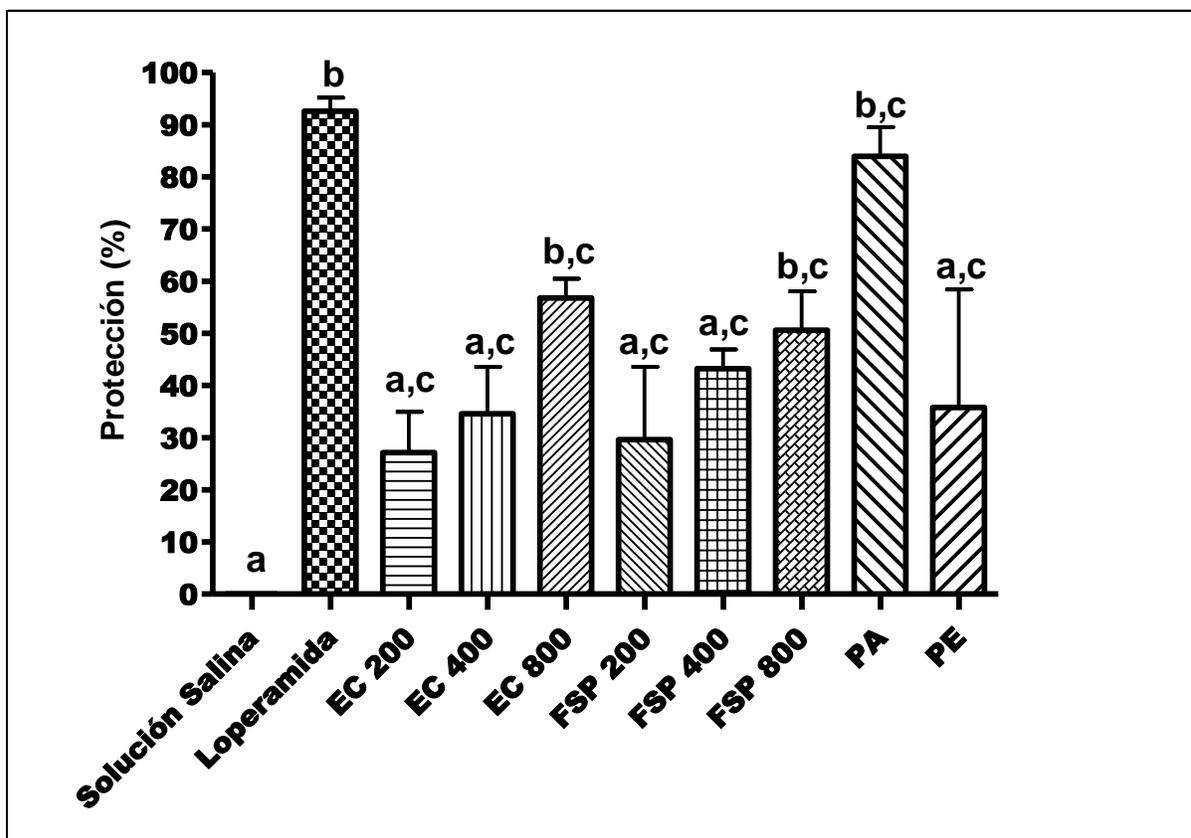
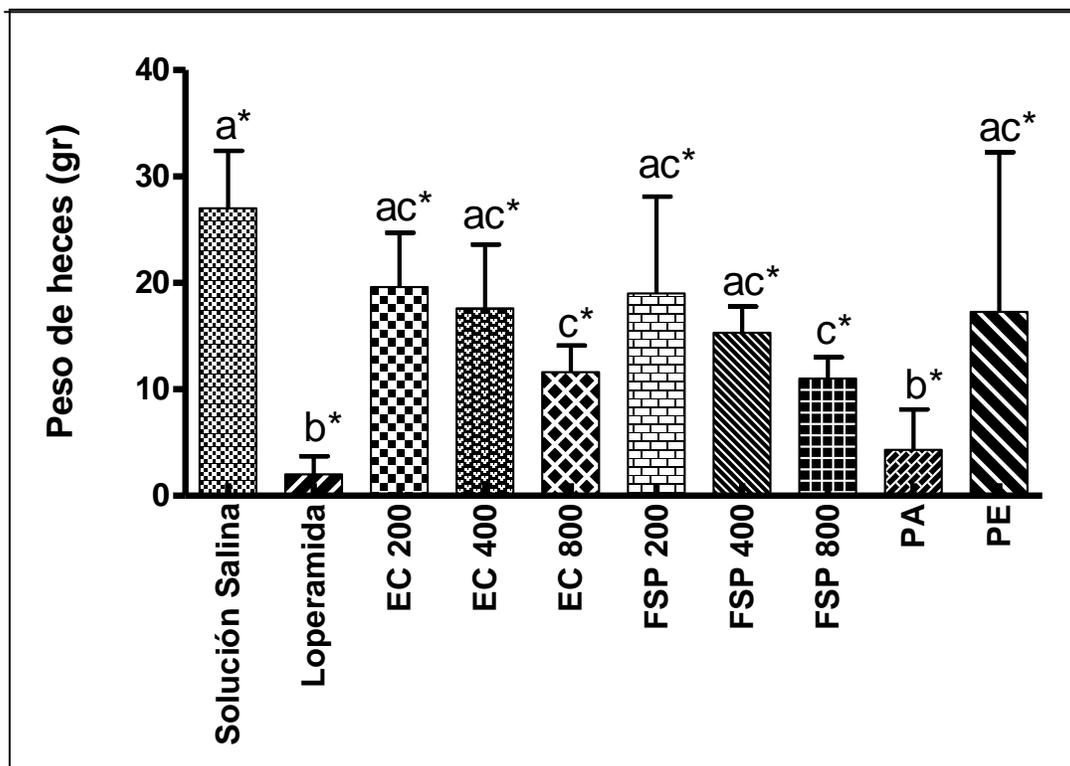


Fig. 56.- Protección (%) contra la diarrea de los extractos de las hojas del árbol flor de manita. Los resultados expresan la media y DE (n=6). Las letras indican diferencias significativas  $p < 0.05$  prueba de Tukey. EC: Extracto Crudo, FSP: Fracción sin Pigmentos, PA: Pigmentos Acetónicos, PE: Pigmentos Etanólicos.

En la figura anterior, se muestra gráficamente el porcentaje de protección de cada una de las muestras, se realizó una prueba ANOVA, seguida de una prueba de Tukey. Notándose un mayor porcentaje de protección en el control positivo (loperamida), PA, EC 800, FSP 800. Se puede observar que EC 200, 400, FSP 200, FSP 400 y PE presentan diferencias significativas con el fármaco control (loperamida 3 mg/Kg) y no hay diferencia significativa con el control negativo (Solución Salina). El EC 800, FSP 800 y PA presentaron diferencia significativas con respecto al control negativo, así mismo los resultados obtenidos para EC 800, FSP, PA; no muestran diferencias significativas con el fármaco control (loperamida 3 mg/Kg).

En la Figura 57, se muestra la comparación en cuanto a la cantidad de heces después de las 6 hrs de ensayo de cada uno de los extractos probados, se realizó la prueba de ANOVA, seguida de la prueba de Dunnett.



**Fig. 57.- Efecto de extractos de hojas de flor de manita en diarrea inducida con aceite de ricino en ratas.** Los resultados expresan la media y DE (n=6). \*p < 0.05 (ANOVA) entre los grupos. Las letras indican diferencias significativas p < 0.05 prueba de Dunnett. EC: Extracto Crudo, FSP: Fracción sin Pigmentos, PA: Pigmentos Acetónicos, PE: Pigmentos Etanólicos.

En la figura 57, se puede observar que EC 200, 400, FSP 200, FSP 400 y PE no presentan diferencias significativas con la solución salina. El EC 800, FSP 800 y PA presentaron diferencia significativas con respecto al control negativo. Los resultados obtenidos con los pigmentos acetónicos (PA), no muestran diferencias significativas con la loperamida.

La tabla 53 muestra el número total de heces y la consistencia durante las 6 hrs de ensayo. La ausencia de diarrea fue a partir de la sexta hora; presentándose heces sólidas después de la séptima hora. Como se puede apreciar las mayores concentraciones de los extractos generaron una reducción en el número y la consistencia de las heces.

**Tabla 53.- Número y consistencia de heces.**

Grupo	Número de heces total	Consistencia de heces		
		Líquida	Semisólida	Sólida
Solución Salina (CN)	74	74	0	0
Loperamida 3 mg/Kg (CP)	6	0	0	6
EC 200 mg/Kg	59	57	2	0
EC 400 mg/Kg	53	43	10	0
EC 800 mg/Kg	35	26	9	0
FSP 200 mg/Kg	57	50	7	0
FSP 400 mg/Kg	46	39	7	0
FSP 800 mg/Kg	33	28	5	0
PA 1 mg/Kg	18	16	2	0
PE 1 mg/Kg	52	52	0	0

Los resultados muestran el conteo total de las heces de cada grupo (n=6).

EC: Extracto Crudo, FSP: Fracción sin Pigmentos, PA: Pigmentos Acetónicos, PE: Pigmentos Etanólicos, CN: Control Negativo, CP: Control Positivo.

Otro parámetro que se evaluó fue el tiempo transcurrido de la administración del aceite de ricino y el inicio de la diarrea. Como se puede apreciar, conforme incrementan las concentraciones de los extractos se retrasa este inicio de la diarrea y es comparable al efecto observado con el control positivo, donde defecaron a la cuarta hora con heces firmes, lo que se muestra a continuación.

**Tabla 54.- Inicio de diarrea (hr) en los grupos tratados con controles y extractos de hojas de flor de manita.**

<b>Grupo</b>	<b>Tiempo en que inició la diarrea (horas)</b>
Solución Salina (Control negativo)	2 <sup>da</sup> hora de tratamiento
Loperamida 3 mg/Kg (Control positivo)	4 <sup>ta</sup> hora de tratamiento
EC 200 mg/Kg	3 <sup>ra</sup> hora de tratamiento
EC 400 mg/Kg	2 <sup>da</sup> hora de tratamiento
EC 800 mg/Kg	4 <sup>ta</sup> hora de tratamiento
FSP 200 mg/Kg	2 <sup>da</sup> hora de tratamiento
FSP 400 mg/Kg	2 <sup>da</sup> hora de tratamiento
FSP 800 mg/Kg	3 <sup>ra</sup> hora de tratamiento
PA 1 mg/Kg	4 <sup>ta</sup> hora de tratamiento
PE 1 mg/Kg	3 <sup>ra</sup> hora de tratamiento

EC: Extracto Crudo, FSP: Fracción sin Pigmentos, PA: Pigmentos Acetónicos,  
PE: Pigmentos Etanólicos.

La tabla 55, muestra el efecto de extractos de hojas de flor de manita en diarrea inducida con aceite de ricino en ratas. En base a los valores se puede notar que el EC de las hojas del árbol flor de manita disminuye la cantidad de heces en 20-40 %; la FSP disminuye la cantidad de heces en un 30-40 %; los PE solo disminuyen la cantidad de heces en un 20 %; y los PA logran disminuir la cantidad de heces en un 70%, todos estos valores comparados con el control positivo.

**Tabla 55.- Efecto de los extractos de las hojas flor de manita en diarrea inducida con aceite de ricino**

Grupo	Media de defecaciones por grupo de ratas (gr)	100%
Solución Salina Control Positivo	10.5 ± 2.4	100 %
Loperamida (3 mg/ml) Control Negativo	3 ± 0*	28.57 %
Grupo I.- EC 200 mg/Kg	8.16 ± 3.37	77.71 %
Grupo II.- EC 400 mg/Kg	8.83 ± 3.06	84.09 %
Grupo III.- EC 800 mg/Kg	6.83 ± 1.32*	60.04 %
Grupo IV.- FSP 200 mg/Kg	8 ± 3.16	76.19 %
Grupo V.- FSP 400 mg/Kg	7.5 ± 3.20	71.42 %
Grupo VI.- FSP 800 mg/Kg	7.33 ± 3.88	69.80 %
Grupo VII.- PA 1 mg/Kg	2.66 ± 4.17*	25.33 %
Grupo VIII.- PE 1 mg/Kg	8.5 ± 6.55	80.95 %

Los valores se expresan como la media ± DE (n=6).

\*P<0.05 (Grupos I-VIII vs. CP) (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett).

EC: Extracto Crudo, FSP: Fracción sin Pigmentos, PA: Pigmentos Acetónicos, PE: Pigmentos Etanólicos.

### 3.- Motilidad Intestinal

Se evaluó la Inhibición de motilidad gastro-intestinal de extractos de hojas de flor de manita, evaluando la longitud del intestino delgado, la distancia recorrida por el carbón activado, así como el porcentaje de protección de dichas muestras. La distancia intestinal del carbón se mueve desde el píloro, se midió como el valor calculado como el porcentaje de la longitud total del intestino.

**Tabla 56.- Motilidad intestinal de los extractos de las hojas del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).**

Muestra	Longitud total el intestino delgado	Recorrido total del carbón activado	Intervalo de % de protección
Solución Salina (Control negativo)	143 ± 3.67	94.5 ± 16.26	66 - 74 %
Loperamida (Control positivo)	127.4 ± 12.05	69.7 ± 38.14	56 - 88 %
EC 200 mg/Kg	133.6 ± 10.83	81.4 ± 19.75	61 - 78 %
EC 400 mg/Kg	135.8 ± 6.30	100.25 ± 9.53	73 - 80 %
FSP 200 mg/Kg	131 ± 9.87	92.2 ± 10.42	70 - 81 %
FSP 400 mg/Kg	132.6 ± 7.16	91.6 ± 17.83	69 - 83 %
PA	139.2 ± 4.65	81.25 ± 12.54	56 - 61 %

Los valores se expresan como la media ± DE (n=6).

Las fotografías siguientes (Figura 58), muestran la evaluación de la motilidad intestinal.



Fig.58.- Evaluación de motilidad en intestino delgado.

## IX.- DISCUSION

Las flores y hojas del árbol de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), son utilizadas para curar diferentes afecciones, en Michoacán son muy utilizadas en zonas cálidas para tratar enfermedades gastrointestinales, basándose en la medicina tradicional. Existen reportes farmacológicos de diferentes propiedades de las flores y solo existen dos reportes respecto a las hojas (Introducción, sección 2.3). Hasta donde sabemos, no existen estudios farmacológicos de propiedades antibacterianas o antidiarreicas reportadas.

Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis se enfocó en determinar la actividad anti-diarreica *in-vivo* de los extractos de las hojas del árbol flor de manita así como la determinación de su actividad anti-bacteriana *in-vitro* y su acción sobre la motilidad intestinal.

Los resultados de la actividad antibacteriana *in-vitro* de cada uno de los extractos de las hojas del árbol flor de manita arrojaron que el EC presentó una mayor afinidad para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, seguida de *Escherichia coli* ATCC 27543, *Salmonella typhimorium* ATCC 14028 y por último *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 (Tabla 51), que indica que los componentes de las hojas del árbol flor de manita como flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, quinonas, saponinas, en conjunto tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias. Venkatesan y col, 2005 dicen que la actividad anti diarreica de taninos, flavonoides, terpenos y carbohidratos ha sido ampliamente demostrada, por lo que estos compuestos pueden ser los responsables de la actividad anti-bacteriana de los extractos de las hojas del árbol flor de manita.

En el caso de *Escherichia coli* de diferente ATCC se encontró que el EC tiene una muy alta especificidad contra ATCC 27543 y no tiene actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922, lo que probablemente se deba a que pueda existir una inhibición en la actividad del extracto crudo por la participación de más de un carbohidrato o componente (Lis y Sharon, 1998).

En la flor de manita se ha reportado que presenta actividad antibacteriana contra diferentes tipos de bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 (56.8 %), *Escherichia coli* 0157:H7 (59.0 %), *Shigella sonnei*-1 (73.3 %), *Shigella Sonnei*-2 (71.4 %), *Sh. flexneri*-1 (42.9 %), *Sh. flexneri*-2 (51.5%), *Salmonella sp*-1 (50.0 %), *Salmonella sp*-2 (50.0 %) (Velázquez, 2006), las diferencias encontradas en éste trabajo probablemente se deba a que la composición es diferente entre flores y hojas.

La actividad antibacteriana encontrada del extracto crudo es semejante a lo encontrado en extractos acuosos de otras plantas; ejemplo de esto es lo reportado por Brugués y col, 2007 para la actividad anti bacteriana de *Sida rhombifolia* L. y para lo reportado para *Luffa cylindrica* L; por de la Paz y col, 2012.

Uno de los objetivos de éste trabajo es encontrar el o los componentes activos de los extractos acuosos de las hojas de flor de manita, para que por un lado se comprenda cual o cuales compuestos son los responsables de la actividad encontrada así como para poder hacer posteriormente un fitomedicamento.

Por lo anterior se analizaron los diferentes componentes del extracto acuoso o crudo de ésta planta. Inicialmente se separaron los pigmentos para obtener una fracción sin pigmentos, posterior a esto se separaron los componentes lipídicos con el método de Folch de donde se obtuvieron dos fracciones denominadas F1 y F2. Para en EC la fracción F1 contiene algunas proteínas, pigmentos y metanol; la fracción F2 contiene la mayor parte de proteínas. Así la F2 es una fracción proteica enriquecida. Mientras que para la FSP la fracción F1 contiene algunas proteínas y metanol y la fracción F2 es también una fracción proteica enriquecida. Todas las fracciones fueron dializadas y liofilizadas antes de ser analizadas para evitar una posible alteración en el resultado.

El EC F1 presenta una mayor actividad anti bacteriana *in-vitro* contra *Escherichia coli* ATCC 27543, seguida de una actividad igual para, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (Tabla 51). El EC F2 presenta la misma actividad anti bacteriana *in-vitro* hacia *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* ATCC 25922,

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (Tabla 51).

Como se puede apreciar ambas fracciones tienen actividad anti microbiana *in-vitro* para las mismas bacterias lo cual nos sugiere que en ambas muestras se encuentran las mismas lectinas con afinidad hacia los carbohidratos de superficie de esas bacterias; por lo que al estar la fracción F2 enriquecida en proteínas se nota la mayor actividad que tiene hacia los microorganismos.

Uno de los objetivos de la remoción de pigmentos es corroborar que las actividades biológicas no se deben exclusivamente a los pigmentos, como se describió en la introducción (Pág. 12).

Así se encontró que la fracción sin pigmentos (FSP) presenta una mayor actividad antibacteriana *in-vitro* contra *Escherichia coli* ATCC 27543 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, seguida de *Escherichia coli* ATCC 25922, esto nos indica que al trabajar con la hoja sin pigmentos la actividad antibacteriana no se pierde, al contrario incrementa al tener la actividad contra una de las cepas con la que la hoja con pigmentos no cuenta. La FSP F1 y F2 presentan una mayor actividad anti bacteriana *in-vitro* contra *Escherichia coli* ATCC 27543, seguida de *Escherichia coli* ATCC 25922. En la FSP F2 también se observó contra otras bacterias (Tabla 51).

Compuestos como los terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, pueden ser los responsables de la actividad anti bacteriana en las fracciones F1 y F2 (García, 2006). Esto nos sugiere que la poca concentración de proteína presentes en la fracción F1 se ve reflejada en la baja actividad anti bacteriana que presenta, es decir, sólo hacia dos microorganismos; mientras que la fracción F2 al ser rica en proteínas tiene una mayor actividad anti bacteriana, siendo activa contra cinco microorganismos, suponiéndose también que en esta fracción se encuentra una mezcla de lectinas que le dan esa amplia actividad.

Al analizar los pigmentos Acetónicos (PA) se encontró que presenta una mayor actividad antibacteriana *in-vitro* contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, seguida de *Escherichia coli* ATCC 27543, seguida de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y por último

*Staphylococcus aureus* ATCC 27543 (Tabla 51), como se puede notar la actividad la de los pigmentos es mayor que la de los otros extractos; ya que los pigmentos Etanólicos (PE) no presentan actividad antibacteriana *in-vitro* contra ninguna de las cepas ATCC usadas.

Se han determinado diferentes actividades biológicas para los flavonoides entre las que se encuentran la actividad anti-bacteriana y las evidencias experimentales de que algunos flavonoides aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones (Martínez, 2005).

Lo que sugiere que si bien los pigmentos pueden representar parte de la actividad en el EC, su actividad es mucho mayor individualmente, es decir, sin el resto de los componentes de la hoja, teniendo en cuenta que los pigmentos se utilizaron en una manera concentrada (1mg/mL) potenciando así su efectividad y explicando así la mayor actividad anti bacteriana *in-vitro* de los pigmentos acetónicos, ya que sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y cumarina), pueden ser los responsables de la actividad anti bacteriana de estos extractos (García, 2006).

Mientras que los pigmentos etanólicos carecen de taninos, que son los que podrían darle a estos la actividad anti bacteriana (Taiz y col., 2006; [www.agro.unlpam.edu](http://www.agro.unlpam.edu) ).

Nathan Sharon y Halina Lis junto con sus colaboradores fueron los primeros en describir las lectinas en la superficie celular en los años 70's. Estas lectinas también tienen actividad hemaglutinante, pero su función principal es la de facilitar el ataque o adherencia de la bacteria a la célula hospedera, un pre requisito para la colonización bacteriana y la infección. Esta lectinas bacterianas fueron llamadas adhesinas, y los ligandos glicanos, en la superficie de la célula hospedera son llamados receptores (Varky y col., 2009).

El hecho de que el EC F1 tenga actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y el EC no la presente se puede deber a que los lípidos estén interfiriendo en el reconocimiento lectina-carbohidrato.

El extracto crudo de hojas de flor de manita contiene lectinas con afinidad para Gal-Gal-Fuc; el EC F1 contiene lectinas con afinidad para Gal-Gal-Fuc y

además para Fuc-Gal; el EC F2 contiene lectinas con afinidad para GalNAc -Gal-Fuc; la FSP contiene lectinas con afinidad para Fuc-Gal; la FSP F1 contiene lectinas con afinidad para GalNAc-Gal-Fuc; la FSP F2 presenta lectinas con afinidad para Gal-Gal-Fuc y Fuc-Gal (Martínez, 2013).

La bacteria *Escherichia coli* reconoce los carbohidratos GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer presentes en los órganos diana en los que al reconocerlos se adhieren y comienza la colonización y la infección, de igual manera la *Escherichia coli* presenta en su superficie carbohidratos Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(NeuAc $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer que son los que reconocen las lectinas presentes en las hojas del árbol flor de manita y uniéndose a ellos, evitando el crecimiento bacteriano (Varky, 1999).

Los extractos que presentan actividad anti bacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* es porque la bacteria reconoce los carbohidratos GalNAc $\beta$ 4Gal presentes en los tejidos diana esto permite la colonización del microorganismo y las lectinas de las hojas del árbol flor de manita reconocen a los carbohidratos de la superficie de *Pseudomonas aeruginosa* que son GlcNAcGlcNAcGlucuraminoGal (Varky, 1999).

Mientras que los extractos que presentan actividad anti bacteriana contra *Staphylococcus aureus* es debida a los carbohidratos de superficie de la bacteria que son GlcNAcMurNAc, así como también presenta lectinas que reconoce los carbohidratos presentes en los tejidos diana, los cuales son, D-galactosa, ácido D-glucourónico y N-acetilglucosamina (Varky, 1999).

Para los extractos con actividad anti bacteriana *in-vitro* contra *Salmonella typhimurium*, su actividad es debida a que en su superficie tiene los carbohidratos Gal $\beta$  (1-3) GalNAc (Giannasca y col, 1996), los cuales son reconocidos por las lectinas presentes en las hojas del árbol flor de manita.

Como se aprecia en los resultados de la actividad antibacteriana *in-vitro*, todos los extractos de las hojas del árbol flor de manita (a excepción del los PE, que no presentan actividad contra ningún microorganismo) presentan actividad anti bacteriana contra las dos cepas de *Escherichia coli*, mostrando mucha mayor actividad las hojas del árbol flor de manita tanto frescas como secas; en

comparación con lo reportado para las hojas de *Rubus urticaefolius* por de Paula y col en el año 2000; donde las hojas tanto secas como frescas no presentan actividad contra *Escherichia coli*.

Para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en base a lo reportado para las hojas de *Psidium guajava* por Martínez y col, 1997; la actividad que presentan las hojas del árbol flor de manita es ligeramente menor a las hojas de esta planta, siendo aún así de gran importancia los datos obtenidos.

En el trabajo reportado por Guerra y col en el año 2004, donde prueban la actividad anti bacteriana de *Senna alata L*, los extractos de las hojas del este ejemplar no presenta actividad contra *Salmonella typhimurium* siendo este microorganismo resistente a los extractos; lo que indica el posible gran uso de las hojas del árbol flor de manita; ya que éstas si presentan actividad anti bacteriana contra este microorganismo.

La concentración de compuestos presentes en cada extracto será el factor determinante para que la actividad anti bacteriana *in-vitro*. Los compuestos se pueden encontrar muy concentrados, interaccionando entre ellos por lo que no se ven halos de inhibición y es necesario hacer varias diluciones para que se pueda apreciar. Éste fenómeno se observó en diferentes extractos (Fig.8; Fig.13; Fig.14; Fig.20; Fig.21; Fig.22; Fig.31; Fig.39; Fig.42; Fig.43; Fig.44)

Una vez que se cumplió con el primer objetivo de éste trabajo, se prosiguió con la determinación de la actividad anti-diarreica *in-vivo* de los extractos de las hojas basado en el método de (Edwin y col, 2007; Escobar y col, 2010), basado en este trabajo y en la ausencia de toxicidad de los extractos (Martinez, 2013), se seleccionaron la dosis de 200 mg/Kg, 400 mg/Kg, 800 mg/Kg (en base a los lineamientos de la OCDE), se puede ver que conforme se aumenta la dosis de cada extracto la cantidad de heces disminuye aumentando así el porcentaje de protección. Las dosis usadas tuvieron una marcada actividad anti diarreica en las ratas usadas en el modelo de diarrea inducida por aceite de ricino (Edwin y col., 2007; Lin y col., 2002); se trató además de realizar un modelo experimental mediante la administración directa de bacterias, la cual no fue posible estandarizar por lo que se optó por no usarse.

De manera particular se determinó también que los extractos con mayor actividad anti diarreica fueron el EC 800 mg/Kg, la FSP 800 mg/Kg y los pigmentos acetónicos, con respecto al control negativo. Así mismo todos los extractos presentaron diferencias significativas respecto al fármaco control (Loperamida 3mg/Kg) a excepción de los pigmentos acetónicos que no presenta esta diferencia lo que nos indica que los pigmentos acetónicos se acercan mucho a la eficacia que tiene el fármaco control.

La medición del tiempo de inicio de la diarrea indica la eficacia de cada dosis de tratamiento usada y es importante para conocer el tiempo de acción terapéutico. La aparición de la diarrea fue en promedio entre la segunda y tercer hora de comenzado el ensayo sin haberse presentado conducta extraña en los animales, la aparición de heces sólidas fue a partir de la séptima hora del ensayo. Por otra parte ninguna de las dosis de los extractos utilizados alteró la defecación normal de los animales, ya que no modificaron nada más allá de la consistencia de las heces, manteniéndose el color y olor característico de las heces en las ratas.

El aceite de ricino tiene su acción sobre la estimulación de la secreción intestinal de agua y electrolitos y la motilidad intestinal. El responsable de la acción, ácido ricinoleico, se libera a nivel intestinal estimulando la liberación de agua e impidiendo la reabsorción. Además estimula la producción de PGE<sub>2</sub> (Lorenzo y col., 2009; [www.vademecum.es](http://www.vademecum.es)); por lo que se puede pensar que los extractos de las hojas del árbol flor de manita tienen acción sobre la cantidad de agua liberada permitiendo que sea reabsorbida y por mecanismos relacionados con la liberación de prostaglandinas, dependiendo en mayor medida de la dosis del extracto administrada; este mecanismo también es propuesto para los extractos de *Euphorbia hirta* reportado por Lorente en 2003. El mecanismo de acción queda por ser estudiado.

Para reforzar más aun los resultados de la actividad anti diarreica *in-vivo*, se tiene los resultados de la actividad anti bacteriana *in-vitro* expuestos en este mismo trabajo. Para que las personas al tratar de tomar las hojas del árbol flor de manita como tratamiento contra la diarrea lleguen a alcanzar la dosis de 800 mg/Kg que fue la que mayor actividad anti diarreica presenta, se propone la

preparación de un té; que contenga 2 hojas del árbol flor de manita por cada 250 mL de agua, tomarse esta dosis cada 8 hrs. Esto basándose en la cantidad de proteína presente en las hojas que es de 3.84 mg/hoja.

El efecto inhibitor sobre la motilidad digestiva se lleva a cabo sobre todo el aparato gastrointestinal; incrementando el tono y reducen la motilidad del antro gástrico y del píloro, provocando un retraso del vaciamiento del estómago; aumentan el tono y las contracciones no propulsivas en intestino delgado y colon, disminuyendo la actividad peristáltica y, por lo tanto, dificultando el avance de la masa fecal, mejorando la consistencia en los pacientes con diarrea (Lorenzo y col., 2009), en comparación con el control negativo los extractos de las hojas de flor de manita permiten el retraso del vaciamiento del estómago.

Las FSP así como su fracción orgánica y su fracción proteica no fueron probadas de manera *in-vitro* por varias razones; una de ellas es que en la medicina tradicional o en nuestra casa no podríamos obtener estas fracciones; es decir siempre se utilizarán las hojas tal cual del árbol. Otra de las razones es que la concentración de proteínas presentes en dichas fracciones es baja (FSP: 0.31 mg/mL; FSP F1: 0.1 mg/m; FSP F2: 0.32 mg/mL) y para alcanzar las dosis se necesita mucha muestra; tanto sin pigmentos como para obtener las fracciones; pero se consideran estas fracciones para su futuro análisis.

La actividad anti bacteriana *in-vitro*, actividad anti-diarreica *in-vivo*, son evidencias sobre la inhibición de algún agente causal de la diarrea, por lo que las evidencias anteriores permiten proponer el uso de las hojas del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) en el tratamiento de la diarrea, ya que el uso de los extractos vegetales es limitado, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra y no generarían resistencia debido a la interacción carbohidratos-lectinas, esto también es importante para probar los extractos de las hojas del árbol flor de manita contra otra cepas bacterianas; así como tratar de hacer los mismo con otros extractos naturales.

Para determinar si la inhibición de los extractos de las hojas del árbol flor de manita sobre la motilidad intestinal es amplia, se sugiere corroborar los datos de nueva cuenta.

## X.- CONCLUSIONES

- Se comprobó la actividad anti bacteriana *in-vitro* de los extractos de las hojas del árbol flor de manita.
- Se comprobó la actividad anti-diarreica *in-vivo* de los extractos de las hojas del árbol flor de manita.
- Se comprobó la acción sobre la inhibición de la motilidad intestinal de los extractos de las hojas del árbol flor de manita.
- En el EC y la FSP, los mejores resultados anti diarreicos observados fueron con la dosis de 800 mg/Kg.
- Los Pigmentos Acetónicos tuvieron los mejores resultados, estando siempre a la par a los del control positivo (loperamida 3 mg/Kg).
- Los Pigmentos Acetónicos pueden ser objeto de futuros estudios, tomando como base su actividad anti diarreica.
- Los pigmentos alcohólicos no presentaron actividad anti bacteriana *in-vitro*.
- Los resultados obtenidos en este trabajo confirma el posible uso de las hojas del árbol flor de manita como un tratamiento en el control de la diarrea.
- Las hojas del árbol flor de manita pueden llegar a representar una apoyo importante para el control de enfermedades como la diarrea; y con estudios posteriores para otras enfermedades, siendo así una opción terapéutica de origen natural.

Los extractos de las hojas del árbol flor de manita presentan actividad anti bacteriana *in-vitro* y anti-diarreica (*in-vivo*); esta actividad va a depender en gran medida de la dosis administrada; por lo tanto el uso de extractos naturales es en gran medida una buena herramienta para tratar padecimientos comunes y aunque empíricamente su uso está comprobado, la investigación científica de estos extractos darán un importante apoyo al uso seguro de éstos contra muchos padecimientos; reduciéndose de manera importante los efectos no deseados de los fármacos sintéticos.

## XI.- PERSPECTIVAS

- Determinar si los extractos de las hojas del árbol flor de manita presentan la misma actividad que las flores del árbol flor de manita frente a otras enfermedades como las enfermedades cardiacas.
- Evaluar la actividad anti bacteriana de los pigmentos acetónicos de las hojas del árbol flor de manita, contra otros microorganismos causantes de diarrea.
- Evaluar la actividad anti diarreica *in-vivo* de las fracciones orgánica y proteica del EC de las hojas del árbol flor de manita.
- Evaluar la actividad anti diarreica *in-vivo* de la FSP así como sus fracciones orgánica y proteica de las hojas del árbol flor de manita.
- Purificación de lectinas con actividad anti bacteriana de las hojas del árbol flor de manita.
- Determinar la actividad anti-diarreica *in-vivo* en otras especies animales.
- Evaluar la actividad anti fúngica de los extractos de las hojas del árbol flor de manita.

**XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:**

- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. En Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&i d=7950>
- Ausina, V., Moreno, S. 2006. Infecciones por Enterobacterias Patógenas Primarias. En Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Médica Panamericana. España. Cap. 28: 328-329.
- Baños, J.E., Farré, M. 2002. Principios de Farmacología Clínica. Bases científicas de la utilización de medicamentos. MASSON, Barcelona: 31.
- Brugués, K., Ruguero, M.T. 2007. Evaluación Preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad anti microbiana de *Sida rhombifolia* L. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. IX. No. 1: 5-13.
- Calvo, M., Planas, M. 2008. Tratamiento Nutricional y Farmacológico de la diarrea. En Interrelación entre fármacos y nutrientes en situaciones fisiopatológicas determinadas. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, Barcelona: 93 - 107.
- Casanueva E., Kaufer, M., Pérez, A.B., Arroyo, P. 2008. Nutriología Médica. Médica Panamericana. México, DF: 343.
- Chanfón, S. 2007. Flor de manita. Una “manita” para el corazón y los nervios. CONABIO. Biodiversitas 74: 13-15.
- *Chiranthodendron pentadactylon*.  
[http://es.wikipedia.org/wiki/Chiranthodendron\\_pentadactylon](http://es.wikipedia.org/wiki/Chiranthodendron_pentadactylon).
- Davey, F., Herman, C., McPherson, R., *et al.* 2007. Pruebas de sensibilidad *In-vitro* a los antimicrobianos. En El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. MARBÁN, España. Cap. 51: 1123-1125.
- De Paula, J, Martins de Siqueira A. 2000. Acción Antibacteriana de Extractos Hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev. Cub. Plant med; 5(1): 26-29.

- Edwin, E., Sheeja, E., Toppo, E., Tiwari, V., Dutt, K.R. 2007. Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra Choisy*). *Ars Pharm*; 48 (2): 135-144.
- Enfermedades Gastrointestinales.  
<http://es.scribd.com/doc/103271161/Enfermedades-Gastrointestinales>
- Escobar, M.L., Pinto, J., Zabalaga, S., Escalante, A., Bustamante, Z. 2010. Evaluación de la actividad antidiarreica y antibacteriana de los extractos de la semilla de palto (*Persea americana*) y buganvillia (*Bougainvillea glabra*). *BIOFARBO*, 18 (2), 53-60.
- Galbis, J.A. 2004. Panorama Actual de la Química Farmacéutica. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Madrid: 17.
- García, C. 2006. Actividad Antibacteriana de Extractos Vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. Pág. Xii.
- Giannasca, K.T., Giannasca, P.J., Neutra, R. 1996. Adherence of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 cells: identification of a glycoconjugate receptor. *Infect. Immun.* Vol 64 no. 1: 135-145.
- Gil, P. 2012. Purificación y Caracterización Bioquímica y Antibacteriana de lectinas de hojas de Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*). UMSNH 110 págs. Tesis de Maestría.
- Giraldo, G.A., Loango, N., Mejía, C.M. 2010. Laboratorio de Bioquímica: Una visión práctica. Universidad de Quindío: 108.
- Girón, J., Pedroche, J., Rodríguez, J.M., Millán, F. 2005. Proteínas Alimentarias y Coloides de Interés Industrial. DISEÑO SUR, Sevilla: 375.
- Gracia, M. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.  
[http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf)
- Granda, M. Escala de McFarland. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://es.scribd.com/doc/110229611/practica-de-escala-McFarland>

- Guerra, M., Sánchez, E., Gálvez, M. 2004. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. Rev. Cubana Plant Med 9 (1).
- Hernández, C., Aguilera, G., Castro, G. 2011. Situación de las Enfermedades Gastrointestinales en México. En ENF. INF. MICROBIOL 31 (4): 137-151.
- Hernández, G., Moreno, A., Zaragoza, F., Porras, A. 2011. Tratado de Medicina Farmacéutica. Médica Panamericana, Madrid: 181.
- Iáñez, E. 1998. Hipertextos del área de la Biología. Crecimiento a nivel de poblaciones en Curso de Microbiología General.  
[http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/14\\_micro.htm](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/14_micro.htm)
- Importancia de los productos naturales.  
[http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080126001/1080126001\\_04.pdf](http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080126001/1080126001_04.pdf).
- Izquierdo, M. 2008. Biomecánica y bases neuromusculares de la actividad física y el deporte. Tratado de Medicina Farmacéutica. Médica Panamericana, Madrid: 648.
- Koolman, J., Röhm, H. 2004. Bioquímica. Texto y Atlas. Médica Panamericana, Madrid: 78.
- Landivar, J., Landivar, E., Prieto, M. 2004. Historia de la Medicina. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas: 51.
- Lifchitz, A. 2006. Guía Práctica de Botánica Universal. En Plantas Medicinales. Kier S.A. Buenos Aires: 199.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that Mediate Cellular Recognition. Chem. Rev. 98: 637-674.
- López, A.C., Moreno, L., Villagras, V. 2006. Manual de Farmacología. ELSEVIER, Madrid: 161-163.
- Lorente, M.D. 2003. Estudio Farmacognóstico de *Euphorbia hirta* L. Departamento de Farmacología. Editorial de la Universidad de Granada. Tesis Doctoral.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., Potolés, A. 2009. Farmacología Básica y Clínica. 18ª edición. Médica Panamericana, Madrid: 34-35.

- Lin, J., Puckree, T., Mvelase, T.P. 2002. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *Journal of Ethnopharmacology*: 79, 53–56.
- Lozoya, L. X. 1976. Estado Actual del Conocimiento en Plantas Medicinales Mexicanas. En Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. México, DF: 98- 99.
- Martínez, A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, Medellín: 15-16-44.
- Martínez, L. 2010. Fitoterapia mexicana es una tradición milenaria. <http://www.salud180.com/salud-z/fitoterapia-mexicana-es-una-tradicion-milenaria>
- Martínez, M.J., Molina, N., Boucourt, E. 1997. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del *Psidium guajava*. *Rev. Cub de Plant Med*; 2 (1): 12-14.
- Méndez, I. 2006. Validación Farmacológica de la actividad analgésica de las infusiones de la corteza de *Spondias purpurea* L (jocote), hojas de *Chiranthodendron pentadactylon* (manita) y *Croton guatemalensis* (copalchi). UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA. FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2484.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2484.pdf)
- Martínez, E.J. 2013. Determinacion de la Toxicidad Aguda y Crónica de extractos de hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*). UMSNH 108 págs. Tesis Licenciatura.
- Mendoza, N. 2008. Farmacología Médica. Médica Panamericana. México, DF: 05, 06.
- Trejo, B., Díaz, J.L., Mendoza, L., Ferreira, E., Hernández, M.I., Montoya, A., Chilian, O., García, L., Téllez, M. 2012. Vacunación, infecciones respiratorias y enfermedad diarreica. En Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- México desconocido. La flor de manita y sus propiedades medicinales. <http://www.mexicodesconocido.com.mx/flor-de-la-manita.html>

- Moncada, J. 2005. Estadística para ciencias del movimiento humano. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José: 14-32.
- Montoya, H. 2008. Microbiología Básica para el Área de la Salud y afines, 2ª edición. Universidad de Antioquia, Medellín: 73-90-224.
- Morales, MA., Morales, J.P. 2009. Plantas Medicinales, Fitofármacos y Fitomedicamentos: hacia una fitomedicina (Fitoterapia moderna y racional), basada en la evidencia científica. En Plantas Medicinales y Medicina Natural.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- Muñoz, F. 2002. Plantas Medicinales y Aromáticas, estudio cultivo y procesado. Grupo Mundi-Prensa, España: 15-19.
- Organización Panamericana de la Salud. 2008. Tratamiento de la Diarrea. En Manual Clínico para los Servicios de Salud. [http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/tratamiento\\_diarrea\\_mc.pdf](http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/tratamiento_diarrea_mc.pdf)
- Prats, G. 2007. Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, Madrid: 24.
- Prats, G. 2008. Bacteriología. En Microbiología Clínica. Médica Panamericana. España. Cap. 3: 48-52.
- Quick Start™ Bradford Protein Assay. Instruction Manual. 200 [http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/BioRad\\_proteinassay.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/BioRad_proteinassay.pdf)
- Ramírez, A. 1978. Bibliografía Comentada de la Medicina Tradicional Mexicana (1900-1978). En Monografías Científicas III-IMEPLAM. 1ra edición. México, DF.: 11-12.
- Ramírez, J.S. 2006. Liofilización de Alimentos. Universidad del Valle. Cali: 01, 02.
- Repetto, M. 1995. Métodos Alternativos: estudios toxicológicos *in vitro*. En Toxicología Avanzada. Díaz de Santos, Madrid: 38.
- Repetto, M., Repetto, G. 2009. Toxicología Fundamental. 4ª. Edición. Díaz de Santos, Madrid: 409.

- Roca, P., Oliver, J., Rodriguez, A. 2003. Bioquímica. Técnicas y Métodos. Helice, Madrid: 239.
- Rodríguez, M. 1998. Elaboración de Fitofármacos. En Introducción a la Fitoterapia y la Medicina Tradicional. Herbal: 48.  
<http://es.scribd.com/doc/109479190/archivo19>
- Romero, R., Herrera, I.F. 2002. Síndrome diarreico infeccioso. Médica Panamericana, México, DF: 93-107.
- Romero, R. 2007. Enterobacterias. En Microbiología y Parasitología Humana. 3a edición. Médica Panamericana. México, DF. Cap.67 y 69: 743-780-781.
- Ruiz, T. 2000. Ser curandero en Uruapan. Instituto Michoacano de Cultura. México, DF: 266.
- Sáenz, D. 1993. Principios de Farmacología General y Administración de Fármacos. Universidad de Costa Rica, San José: 39.
- Sánchez, A. 2011. Anti diarreicos. En Manual de Prácticas del Laboratorio de Farmacia IV (Farmacología Especial). Escuela de Químico Farmacobiología. UMSNH: 24-26.
- Santamarina, M., García, F., Roselló, J. 2000. Biología y Botánica. Tomo II. UNIVERSIDAD POLITECTINA DE VALENCIA: 74-75.
- SECRETARIA NACIONAL DE SALUD., USAID., OPS/OMS., UNICEF. Disentería, Diarrea Persistente y Diarrea Asociada a otras Enfermedades. En Rev. Soc. Bol. Ped. 1995. 34 (2): 75-80.  
<http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnsbp95340208.pdf>
- SEMARNAT. Dirección General del Sector Primario y Recursos Naturales Renovables. SUBSECRETARÍA DE FOMENTO Y NORMATIVIDAD AMBIENTAL. Manual que establece los Criterios Técnicos para el Aprovechamiento Sustentable de Recursos Forestales no Maderables de Clima Templado-Frío.  
[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Manual\\_Clima\\_Templado.pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Manual_Clima_Templado.pdf).

- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. CYTED. Bogotá, Colombia: 166.
- Shiva, C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA. FACULTAD DE VETERINARIA. <http://ddd.uab.cat/pub/tesis/2007/tdx-1203107-171521/cmsr1de1.pdf>
- Sustancias Fenólicas.  
[http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedraspdf/sustancias\\_fenolicas.pdf](http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedraspdf/sustancias_fenolicas.pdf)
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Universitat Jaume. :557.
- The Marshall Protocol Knowledge Base. Autoimmunity Research Foundation.  
[http://translate.google.com.mx/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://mpkb.org/home/patients/assessing\\_literature/in\\_vitro\\_studies&ei=frwaUdTIJlb22gXwuYDwAg](http://translate.google.com.mx/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies&ei=frwaUdTIJlb22gXwuYDwAg)
- Vademecum. Aceite de ricino. <http://www.vademecum.es/principios-activos-aceite+de+ricino-a06ab05>
- Valdés, M.S., Álvarez, A.L., del Barrio, G. 2009. Los modelos animales en la evaluación preclínica de antivirales contra los virus del herpes simple. Rev. Salud Anim. Vol. 31 No. 2: 86-92.  
<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv74art3.pdf>
- Vanaclocha, B., Cañigüeral, S. 2006. Fitoterapia. En Vademécum de Prescripcion. ELSEVIER. España: 29-32.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. editors.1999. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: 429-434.

- Velázquez, C. 2006. Evaluación *in vivo* de la actividad inhibidora de la secreción intestinal inducida por la toxina *Vibrio cholerae* de 26 plantas medicinales: estudio fotoquímico biodirigido del extracto metanólico de las flores de *Chiranthodendron pentadactylon* (Sterculieaceae). INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL. ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA. [http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/1778/1/1365\\_2006\\_ESM\\_DOCTORADO\\_velazquez\\_gonzalez\\_claudia.pdf](http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/1778/1/1365_2006_ESM_DOCTORADO_velazquez_gonzalez_claudia.pdf)
- Viji, M., Murugensan, S. 2010. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of Medicinal Plant *Cardiospermum Halicacabum* Linn. On Journal of Phytology 2010, 2(1): 68–77.
- Villar, A., Mendocilla, M. 2000. Manual de Fitoterapia. Farmacología de las plantas medicinales. Universidad Nacional de Trujillo: 65.
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C. 2009. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. Panamericana. México, DF: 100-147.
- Winn., Allen., Janda., Koneman., Procop., Schreckenberger., Woods. 2008. Enterobacteriaceae. En Diagnóstico Microbiológico. Médica Panamericana, Buenos Aires: Cap. 6: 228-240.
- Zenteno, E., Debray, H., Montreuil, J., 1988. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereuseruca*. FEBS Lett.238: 95-100.