



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTI-BACTERIANA *In vitro* DE
EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES DE MANZANILLA
(*Matricaria chamomilla*)”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA**

PRESENTA:

p. Q.F.B. MARÍA DEL CARMEN ORTIZ GARCÍA

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

**Co-DIRECTORA
D.C. MARÍA DE LA LUZ TORNER AGUILAR**

MORELIA MICHOACÁN, ABRIL , 2015.



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Glicobiología de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección de la D.C. Bertha Fenton Navarro.

Parcialmente apoyado por CIC-UMSNH 16.2-2013, 2014

COMITÉ TUTORAL

M. en F.B. Blanca Nateras Marín

MC. Manuel López Rodríguez

M.C. Alma Rosa García Ríos

DC. Ma. de los Dolores López Calvillo

QFB. Elvira Ramos López

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le quiero agradecer a Dios por permitir mi existencia, haberme guiado a lo largo de mi vida, por ser mi apoyo, mi luz mi camino, y por haberme dado la fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de dificultad.

A mis padres RAUL y FLORINDA por haberme dado la vida, por su inmenso amor incondicional, su apoyo tanto económico como emocional, sus consejos, por creer en mí para llegar hasta donde estoy, sobre todo por el ejemplo de vida que me dieron para ser la persona que ahora soy.

A mi tía AUREA por su amor maternal y cuidados, esos consejos que me ayudaban a salir de problemas y a seguir adelante, por creer en mí y apoyarme.

A mis hermanos Adelina, Salvador, Raul Iván, Ismael y Alberta por ser parte importante de mi vida, por apoyarme en momentos de necesidad, por sus consejos, regaños, sin dejar atrás el apoyo económico que aportaron para mi formación como profesionista. A todos ellos por llenar mi vida de grandes momentos que hemos compartido.

A mis sobrinos por llenar mi vida de alegría y buenos momentos, y por expresarme su cariño cada día.

A mi directora de Tesis la D.C Bertha Fenton Navarro, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi Tesis profesional bajo su dirección, por su apoyo y por ayudarme a crecer profesionalmente, gracias a los conocimientos que me transmitió.

A la Maestra Blanca Nateras Marín, por la confianza que deposito en mí, y por su apoyo y conocimientos transmitidos.

A mis amigos Vianney, Brenda, Laura, Julieta, Vannesa, Fany, Norma, Flor y Sergio, por su apoyo en todo momento, por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Glicobiología, por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación, y por esas horas de trabajo que se hacían más amenas con su compañía, también por sus conocimientos compartidos.

A todos esos amigos que conocí durante mi estancia en Morelia, por los momentos tan amenos vividos, y por el apoyo que todos ellos me brindaron.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

COMITÉ TUTORAL	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
I INTRODUCCIÓN.....	1
1. Principales Enfermedades en México.	1
1.2 Fármacos y efectos secundarios adversos	5
1.2.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular:.....	7
1.2.2 Inhibición de la síntesis de proteínas	11
1.2.3 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.....	13
1.3 Restricción económica en población de bajos y muy bajos recursos.	15
1.4 Terapias alternas	17
2. Usos de Plantas Medicinales	17
2.1 Fitoterapia.....	18
2.2 Principios activos en plantas medicinales.....	19
3. MANZANILLA (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	25
3.1 Descripción	25
3.2 Clasificación Taxonómica.....	26
3.3 Propiedades Farmacológicas reportadas	27
4.- Contaminación en Sistemas de Riego	28
II. JUSTIFICACIÓN	31
III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVO GENERAL	32
V. OBJETIVOS PARTICULARES	32
VI. MATERIAL	33
VII. METODOLOGÍA.....	34
7.1 Extracto Crudo de Hojas de Manzanilla (ECHM)	34
7.2 Pigmentos Acetónicos de hoja de Manzanilla (PACHM).....	34
7.3 Pigmentos Alcohólicos de hoja de Manzanilla (PALHM):.....	34
7.4 Fracción sin Pigmentos de hoja de Manzanilla (FSPHM):	34
7.5 Infusión	35
7.6 Tinción Gram.....	35
7.7 Agar Mueller Hinton	35
7.8 Agar Mac Conkey, Agar Sal y Manitol, Agar Sangre, Agar SS:	35
7.9 Caldo Nutritivo	36
7.10 Escala de McFarland	36
7.11 Preparación del Inóculo	36
7.12 Dilución de pigmentos en DMSO	36
7.13 Cuantificación de proteínas (Método de Bradford):	36
7.14 Estandarización del antibiótico	36
7.15. Antibiograma	37
7.16 Evaluación del efecto Bacteriostático o Bactericida de los Extractos de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>):.....	38
7.17 Análisis Estadístico	38
VIII RESULTADOS	39

8.1 Identificación de la Morfología colonial y microscópica de las Bacterias ATCC.	39
8.2 Evaluación del grado de contaminación de extractos crudos, tés naturales de hoja y flor, y tés comerciales de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>).	48
8.3 Evaluación de la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos de flores y hojas de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>).	54
8.3.1 Evaluación de la capacidad antibacteriana de extracto crudo de Hojas (ECHM) y Flores de Manzanilla (ECFM) contra cepas ATCC.	54
8.3.2 Evaluación de la capacidad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja y Flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra diferentes cepas ATCC.	57
8.3.3 Evaluación antibacteriana de los pigmentos alcohólicos de flor y hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra cepas ATCC.	64
8.4.1 Evaluación del efecto bacteriostático o bactericida de extractos crudos de flores y hojas de Manzanilla.	73
8.4.2 Evaluación del efecto bacteriostático o bactericida de pigmentos acetónicos de flores y hojas de Manzanilla.	75
IX DISCUSIÓN	86
X CONCLUSIÓN	96
XI PERSPECTIVAS	97
XII REFERENCIAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Sitios de secreción de los péptidos antimicrobianos en humanos.....	24
Figura 2 Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	26
Figura 3 a) Morfología colonial de <i>E. coli</i> ATCC 25922 en medio Macconkey. b) morfología microscópica de <i>E. coli</i> ATCC 25922 observada en una tinción Gram.....	39
Figura 4 . a) Morfología colonial de <i>E. coli</i> ATCC 27543 en medio MacConkey. b) Morfología microscópica de <i>E. coli</i> ATCC 27543 observada en una tinción Gram.....	40
Figura 5 a) Morfología colonial de <i>E. coli</i> enterotoxigenica (ETEC) s/n en medio MacConkey. b) Morfología microscópica de <i>E. coli</i> enterotoxigenica(ETEC) s/n observada en una tinción Gram.....	40
Figura 6 a) Morfología colonial de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543 en medio Sal y manitol. b) Morfología microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543 observada en una tinción Gram.....	41
Figura 7 a) Morfología colonial de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en medio Sal y manitol. b) Morfología microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 observada en una tinción Gram.....	42
Figura 8 a) Morfología colonial de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 en agar sangre. b) Morfología microscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 observada en una tinción Gram.....	43
Figura 9 . a) Morfología colonial de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14879 en agar sangre. b) Morfología microscópica de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14879 observada en una tinción Gram.	44
Figura 10 a) Morfología colonial de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 en agar sangre. b) morfología microscópica de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 Observada en una tinción Gram.	45
Figura 11 a) Morfología colonial de <i>Shigella sonnei</i> S/N en agar SS. b) Morfología microscópica de <i>Shigella sonnei</i> S/N observada en una tinción Gram.....	46
Figura 12 a) Morfología colonial de <i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 14027 en agar SS. b) Morfología microscópica de <i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 14027 observada en una tinción Gram.	47
Figura 13 a) Sembrado masivo en agar Mueller Hinton de EC de Hoja de Manzanilla (macerado hoja fresca). b) Tinción Gram de sembrado masivo de EC de hoja de Manzanilla.	48
Figura 14 a) Sembrado masivo en agar MullerHinton de EC de flor de Manzanilla (macerado flor fresca). b) Tinción Gram de sembrado masivo de EC de flor de Manzanilla.	49
Figura 15 a) Sembrado masivo en agar MullerHinton de té Natural de Hoja de Manzanilla (infusión). b) Tinción Gram de sembrado masivo De Té Natural de Hoja de Manzanilla.	50
Figura 16 a) Sembrado masivo en agar MullerHinton de té Natural de Flor de Manzanilla (infusión). b) Tinción Gram de sembrado masivo De Té Natural de Flor de Manzanilla. ...	51
Figura 17 a) Sembrado masivo en agar MullerHinton de té comercial de Manzanilla (bolsa). b) Tinción Gram de sembrado masivo de Té comercial de manzanilla (bolsa)...	52
Figura 18 Actividad antibacteriana de extracto crudo de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	55

Figura 19 Actividad antibacteriana de extracto crudo de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	56
Figura 20 Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543.	58
Figura 21 Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579.....	59
Figura 22 Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Shigella sonnei</i> s/n.	60
Figura 23 Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543.	61
Figura 24 Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579.....	62
Figura 25 Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Shigella sonnei</i> s/n.	63
Figura 26 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543.	65
Figura 27 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	66
Figura 28 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579.....	67
Figura 29 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Shigella sonnei</i> s/n.	68
Figura 30 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	69
Figura 31 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	70
Figura 32 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Penicilinas	8
Tabla 2 Cefalosporinas.....	9
Tabla 3. Carbapenémicos y Monobactámicos	10
Tabla 4. Glucopéptidos.....	11
Tabla 5. Otros Antibióticos inhibidores de la pared celular.....	11
Tabla 6. Aminoglucósidos y Aminociclitoles	12
Tabla 7. Macrólidos.....	12
Tabla 8. Tetraciclinas.....	13
Tabla 9. Clindamicina y Cloranfenicol.....	13
Tabla 10. Quinolonas.....	14
Tabla 11. Sulfonamidas.....	14
Tabla 12 .Sembrados masivos de extractos acuosos, téis naturales de hoja y flor, y de Té comercial (bolsa), de MANZANILLA (Matricaria chamomilla).....	53
Tabla 13. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto crudo de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Escherichia coli ATCC 25922.....	55
Tabla 14. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extracto crudo de Hoja de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Escherichia coli ATCC 25922.....	56
Tabla 15 CIM de los extractos crudos acuosos de hoja y flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) (ECFM, ECHM), contra E. coli ATCC 25922.....	57
Tabla 16. Concentración inhibitoria mínima (CIM) pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Staphylococcus aureus ATCC 27543	57
Tabla 17 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Bacillus cereus ATCC 14579.....	58
Tabla 18 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Shigella sonnei s/n	59
Tabla 19 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Staphylococcus aureus ATCC 27543	60
Tabla 20. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Bacillus cereus ATCC 14579.....	61
Tabla 21 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Shigella sonnei s/n	62
Tabla 22. CIM de pigmentos acetónicos de hoja y flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla), contra diferentes cepas ATCC.	63
Tabla 23 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Staphylococcus aureus ATCC 27543.	64
Tabla 24 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Staphylococcus aureus ATCC 25923	65
Tabla 25 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Bacillus cereus ATCC 14579.....	66
Tabla 26 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (Matricaria chamomilla) contra Shigella sonnei s/n.	67

Tabla 27 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	68
Tabla 28 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.....	69
Tabla 29CIM de pigmentos alcohólicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	70
Tabla 30 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de hoja y flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>), contra diferentes cepas ATCC.....	72
Tabla 31 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución y tiempo, de ECFM contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.	73
Tabla 32. Análisis de variación de absorbancia (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de ECHM contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.	74
Tabla 33. CBM y CBaM de los extractos crudos de hojas y flores de la Manzanilla contra diferentes cepas ATCC.	74
Tabla 34 . Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACFM contra <i>S. aureus</i> ATCC 27543.....	75
Tabla 35. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACHM contra <i>S. aureus</i> ATCC 27543.	76
Tabla 36 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACFM contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579.....	77
Tabla 37 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACHM contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579.	77
Tabla 38. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACFM contra <i>Shigella sonnei</i>	78
Tabla 39. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACHM contra <i>Shigella sonnei</i>	79
Tabla 40 CBM y CBaM de los pigmentos acetónicos de hoja y flor de la Manzanilla contra diferentes cepas ATCC.	79
Tabla 41 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra <i>S. aureus</i> ATCC 27543	80
Tabla 42. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923	81
Tabla 43 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579.....	81
Tabla 44 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra <i>Shigella sonnei</i> s/n	82
Tabla 45 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	83
Tabla 46 Análisis de variación de absorbancias (25 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.	84
Tabla 47 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALHM contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.....	85

Tabla 48 CBM y CBaM de los pigmentos Alcohólicos de hojas y flores de la Manzanilla
contra diferentes cepas ATCC. 85

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
C6	Carbono seis
CBaM	Concentración bacteriostática mínima
CBM	Concentración Bactericida mínima
CIM	Concentración inhibitoria mínima
cm	Centímetros
CONEVAL	Consejo Nacional de la Política de Desarrollo Social
DF.	Distrito Federal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Extracto Crudo
ECFM	Extracto crudo de flores de Manzanilla
ECHM	Extracto crudo de hojas de Manzanilla
ej	Ejemplo
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
Etc.	Etcétera
ETEC	Enterotóxigena
FSP	Fracción sin Pigmentos
g	Gramos
h	Horas
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
lb	Libra
mg/ml	Miligramo/mililitro
MH	Mueller Hinton
min	Minutos
mm	Milímetros
MT	Medicina Tradicional

nm	Nanómetros
OH	Hidróxilo
OMS	Organización Mundial de Salud
OPS	Organización Panamericana de Salud
PACFM	Pigmentos acetónicos de flores Manzanilla
PACHM	Pigmentos acetónicos de hojas de Manzanilla
PALFM	Pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla
PALHM	Pigmentos alcohólicos de hoja de Manzanilla
PAM	Péptidos antimicrobianos
pH	Concentración de iones de Hidrógeno
rpm	Revoluciones partes por millón
s/n	Sin número
SEDESOL	Secretaría de Desarrollo Social
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SNC	Sistema nervioso central
<i>Spp</i>	Todas las especies individuales dentro de un género
SS	Salmonella- Shigella
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
Vol.	Volúmen
WHO	World Health Organization
α	Alfa

RESUMEN

A la manzanilla *Matricaria chamomilla*, le dan usos como antiinflamatorio, regula el movimiento intestinal, es carminativo, emenagogo, analgésico sedante del SNC, antiulceroso gástrico, y cicatrizante entre otros. También se le han comprobado efectos antibacterianos de sus extractos.

En el presente trabajo se evaluó el grado de contaminación de los extractos crudos acuosos y tés naturales de las hojas y flores de Manzanilla, y de un té comercial (bolsa). Los extractos presentaron contaminación bacteriana por cocos Gram (+) y cocobacilos Gram (-) en flor (90%) y hoja (65%). En las infusiones (tés) de los anteriores, la contaminación disminuyó en flor presentando un 30% y en hoja 25%. El sobre de té comercial presentó únicamente 5% de contaminación (cocos Gram positivos).

En la evaluación de la capacidad antibacteriana: los extractos crudos de flores (ECFM) tuvieron efecto contra *E. coli* ATCC 25922 con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0.110mg/ml y los extractos crudos de hojas (ECHM) con una CIM de 0.169 mg/ml.

Los pigmentos acetónicos de flores (PACFM) tuvieron efecto contra *S. aureus* ATCC 27543, *B. cereus* (CIM 2mg/ml), y contra la *Shigella sonnei* (CIM 0.5mg/ml). Los pigmentos acetónicos de hojas (PACHM) contra *S. aureus* ATCC 27543 (CIM 2mg/ml), *B. cereus* ATCC 14579 (CIM 4mg/ml) y *Shigella sonnei* s/n (CIM de 0.5 mg/ml).

Los pigmentos alcohólicos de flor (PALFM) tuvieron efecto contra *S. aureus* ATCC 27543 y ATCC 25923 (CIM 2mg/ml), *B. cereus* ATCC 14579, *Shigella sonnei* s/n, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (4mg/ml) y *L. monocytogenes* ATCC 7644 (0.5mg/ml).

Los pigmentos alcohólicos de las hojas tuvieron efecto contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 (4mg/ml). Las muestras anteriores presentaron efectos bactericidas o bacteriostáticos ante las diferentes cepas, y a diferentes tiempos. La fracción sin pigmentos no presentó actividad antibacteriana, por lo que los componentes activos se encuentran en los pigmentos contenidos en hojas y flores.

Palabras clave: *Matricaria chamomilla*, Medicina tradicional, capacidad antibacteriana, Bacteriostático, Bactericida.

ABSTRACT

The *Matricaria chamomilla*, well-known as chamomile, is used as an anti-inflammatory, intestinal movement regulator, carminative, emmenagogue, analgesic, central nervous system (CNS) sedative, gastric antiulcerative, and healer, among others. Moreover, its extracts have been confirmed to possess antibacterial effects.

This work deals with the pollution level of the raw watery extracts, and natural teas obtained from the chamomile leaves and flowers, as well as commercial tea bags. Raw watery extracts showed the following bacterial pollution growth: Gram cocci (+) and Gram coccobacillus (-) coming from flowers (90%) and from leaves (65%). Pollution levels in natural teas infusions were decreased obtaining 30% in flowers and 25% in leaves. Commercial tea bags showed a 5% growth of Gram cocci (+).

For the antibacterial capability assessment, raw flower extracts had an effect on the *E. coli* ATCC 25922 with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.110 mg/ml and raw leaves extracts with a MIC of 0.169 mg/ml.

Flower acetonc pigments (FAP) had an effect on *S. aureus* ATCC 27543 and *B. cereus* (MIC 2 mg/ml), and against *Shigella sonnei* (MIC 0.5 mg/ml). Leaves acetonc pigments (LAP) had an effect on *S. aureus* ATCC 27543 (MIC 2 mg/ml), *B. cereus* ATCC 14579 (MIC 4mg/ml) and *Shigella sonnei* (MIC de 0.5 mg/ml).

Flower alcoholic pigments (FAP) had an effect on *S. aureus* ATCC 27543 and ATCC 25923 (MIC 2 mg/ml), *B. cereus* ATCC 14579, *Shigella sonnei* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC 4 mg/ml) and *L. monocytogenes* ATCC 7644 (MIC 0.5 mg/ml).

Flower alcoholic pigments had an effect against *L. monocytogenes* ATCC 7644 (4 mg/ml). Last samples showed bactericide and bacteriostatic effects on the different strains and times. Non-pigmented samples did not exhibit antibacterial activity, concluding that active components are found on the leaves and flowers pigments.

Keywords: *Matricaria chamomilla*, Traditional medicine, Antibacterial capability, Bacteriostatic, Bactericide.

ZXXCVV

I INTRODUCCIÓN

1. Principales Enfermedades en México.

En México, al igual que en muchos países, la obesidad y las enfermedades crónicas como es el caso de las de origen cardiovascular, el cáncer, las crónicas respiratorias y la diabetes, se han convertido en un problema de salud pública. La mayoría de estas enfermedades se han ligado con comportamientos poco sanos en relación con la dieta, la falta de actividad física y tabaquismo (Leiner, M. *et al.* 2008).

En el 2012 en la población adolescente de México, en lo que se refiere al diagnóstico previo de diabetes, únicamente 0.7% reportó haberlo recibido. El 1.8% presentó diagnóstico de hipertensión arterial que alcanzó hasta 4.0% entre las mujeres de 16 a 19 años (ENCUESTA ENSANUT, 2012). La detección de diabetes mellitus en adultos fue de 20.9 % en mujeres y 26.4 % en hombres. En cuanto a detección de hipertensión fue de 26.2% en mujeres y 30.6% en hombres. (ENCUESTA ENSANUT, 2012).

Las condiciones de obesidad registradas en el 2012, en niños menores de 5 años es del 9.7%. La prevalencia de obesidad en mujeres mayores de 20 años es de 27.5%, para el caso de los hombres de 20 años o más es de 38.1%.(ENCUESTA ENSANUT, 2012).

Para la población mexicana menor de 20 años la morbilidad hospitalaria por tumores cancerígenos en el 2011, la principal causa la ocupan los tumores malignos en los órganos hematopoyéticos (medula ósea, bazo y timo) que representan 59% de los canceres; En la población mexicana de 20 años y más en el 2011 para los hombres, la principal causa de morbilidad hospitalaria por cáncer se debe a neoplasias en órganos digestivos (23.9%); le siguen los tumores en órganos genitales (12.2%), y los órganos hematopoyéticos (9.8%). En las mujeres, la principal causa de ingreso hospitalario por tumores malignos se deben al cáncer de mama (29.6%), le siguen

las neoplasias en órganos genitales (16.7%) y los órganos digestivos (14.3%), (Estadística a propósito de: INEGI, 2014).

1.1 Enfermedades gastrointestinales y otros (problema de salud en México)

Mundialmente, las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad entre los lactantes y los niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar al 50%; esto depende de factores socioeconómicos y Nutricionales (Vila, J. *et al.*, 2009; Hernández, C. *et al.*, 2011). Estas enfermedades son un problema de Salud Pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, pero los más vulnerables son los niños y ancianos (Hernández, C. *et al.*, 2011).

En México estas enfermedades también ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en población menor de cinco años de edad (Herrera, T. y Montoya, N., 2012). En el año 2003 se realizó un estudio gubernamental, reportando 4,556 decesos causados por infecciones intestinales. En el 2008, el Seguro Social brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales en México, los estados con mayor incidencia de estas infecciones fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Hernández, C. *et al.*, 2011).

Los cuadros gastrointestinales pueden presentarse en cualquier época del año pero el riesgo de sufrir estas enfermedades se incrementa en la temporada de calor. Las manifestaciones clínicas más destacadas en tales enfermedades son: fiebre, vómito, dolor abdominal y diarrea moderada o intensa y esta última es la más frecuente (Hernández, C. *et al.*, 2011). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año, se producen unos dos mil millones de casos de diarrea en todo el mundo (Herrera, T. y Montoya, N., 2012).

Se denomina diarrea al aumento de la frecuencia, volumen y fluidez de las heces, por causa infecciosa, anomalías congénitas (malabsorción), deficiencias enzimáticas, factores mecánicos, endócrinos inmunológicos, nutricionales y tóxicos (Paredes, S. y Roca, F., 2004). Es un síntoma de las infecciones gastrointestinales ocasionadas por muy diversos enteropatógenos virales, bacterianos y parasitarios, los cuales se encuentran y se transmiten por agua con contaminación fecal, alimentos contaminados, o bien de una persona a otra como resultado de una mala higiene (Herrera, T. y Montoya, N., 2012). El mecanismo infeccioso de la diarrea puede ser de tipo invasor o por colonización del tracto intestinal y es toxigénico. En la infección invasiva (disentería) se produce un cuadro inflamatorio difuso, a veces acompañado de necrosis del epitelio y ulceraciones de la mucosa, con pequeños abscesos que dan lugar a la liberación de sangre con gran cantidad de polimorfonucleares y de líquido, incapaz de ser absorbido a causa de la destrucción celular ocasionada por el microorganismo; la fiebre, el dolor abdominal y el tenesmo son síntomas habituales. En el mecanismo enterotoxigénico (diarrea acuosa o secretora): el microorganismo atraviesa la capa mucilaginosa, se une a las células epiteliales y produce la toxina desencadenante de diarrea secretora, se caracteriza por evacuaciones intestinales frecuentes, en gran volumen y casi líquidas (Paredes, S. y Roca, F., 2004; Hernández, C. *et al.*, 2011). Clasificación de acuerdo al tiempo: Diarrea aguda que se presenta como un fenómeno aislado, de naturaleza exógena y duración inferior a dos semanas; y la diarrea crónica suele durar más de dos semanas (Paredes, S., y Roca, F., 2004; Hernández, C. *et al.*, 2011).

Entre los microorganismos bacterianos causantes de las infecciones gastrointestinales están:

Escherichia coli: Bacilo Gram (-), anaerobio facultativo es un microorganismo habitante de la flora normal intestinal del hombre y animales. La mayoría de las infecciones producidas por este microorganismo son endógenas (flora microbiana normal del paciente), las cepas que producen gastroenteritis se adquieren generalmente de forma exógena (Murray, R. *et al.*, 2006; Hernández, C., *et al.*, 2011). Esta bacteria se puede encontrar en el ganado bovino, llega por

contaminación a la carne al momento de manipularla, también se encuentra en agua, leche sin pasteurizar y verduras.

Staphylococcus aureus: coco Gram (+), anaerobio facultativo, se encuentra en la flora normal de la piel y de las superficies mucosas, causa diarrea aguda, acuosa, no complicada a consecuencia de la ingestión de su enterotóxina (Murray, R., *et al.*, 2006). Se encuentra en alimentos muy manipulados y ricos en proteínas como jamones, mayonesas y cremas. También se ha implicado en la diarrea post-antibiótica (Paredes, S., Roca, F., 2004).

Salmonella typhimurium: bacilos Gram (-) anaerobios facultativos, causa más frecuente de diarrea infecciosa en todo el mundo, responsable del 10-50% de todas las diarreas bacterianas, ocasiona diarrea, vómitos y fiebre, la mayoría de las infecciones se adquieren por comer alimentos contaminados (aves, huevos, y productos lácteos), (Murray, R., *et al.*, 2006; Paredes, S., Roca, F., 2004).

Shigella sonnei: bacilos Gram (-), anaerobios facultativos. La transmisión es siempre de persona a persona, por vía fecal- oral, a través del agua, alimentos y fómites. La cantidad de microorganismos que deben ser ingeridos es muy pequeña, pero se multiplican rápidamente en el intestino delgado y en unas 12 horas, alcanzan altas concentraciones. La shigelosis presenta una diarrea que al principio es acuosa y en 1 o 2 días progresa a espasmos abdominales y tenesmo (con o sin heces sanguinolentas), (Murray, R., *et al.*, 2006; Paredes, S., Roca, F., 2004).

Listeria monocytogenes: cocobacilos Gram(+), con frecuencia se disponen en parejas, anaerobio facultativo, causante de una grave enfermedad de mucho riesgo, se asocia al consumo de alimentos contaminados como queso no curado, leche, pavo, vegetales crudos (repollo), o con la diseminación trans-placentaria de la madre al neonato. Los jóvenes ancianos y las mujeres gestantes, así como los pacientes con defectos de la inmunidad celular, tienen el riesgo de padecer esta enfermedad (Murray, R., *et al.*, 2006; Paredes, S., Roca, F., 2004).

Bacillus cereus: bacilos Gram (+), esporulados, anaerobios facultativos, son ubicuos en todo el mundo. Es una bacteria productora de toxina tanto emética como diarreica, las personas en riesgo son las que consumen comidas contaminadas, es muy común encontrarla en arroz, cereales, carnes, vegetales y salsas (Murray, R., et al., 2006; Paredes, S., Roca, F., 2004).

Pseudomonas aeruginosa: Bacilos Gram (-) se disponen habitualmente en parejas, aerobios obligados, pueden causar diarrea como consecuencia de disbacteriosis (Murray, R., et al., 2006; Paredes, S., Roca, F., 2004).

1.2 Fármacos y efectos secundarios adversos

Quimioterápico

Compuesto obtenido totalmente por síntesis química y que desarrolla actividad antimicrobiana (Paredes, S., Roca, F., 2004; Seija, V., y Vignoli, R., 2003).

Antimicrobiano

Es un término que incluye los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética, así como los conseguidos totalmente en el laboratorio (Paredes, S. y Roca, F., 2004; Seija, V., y Vignoli, R., 2003).

Antibiótico

Sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antibacteriana. Su origen puede ser: natural o biológico: Se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias. Semi-sintético: A partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables (Paredes, S., y Roca, F., 2004; Seija, V. y Vignoli, R., 2003).

El año de 1935 fue importante en la historia de la quimioterapia de las infecciones bacterianas sistémicas, se demostró que el colorante rojo de Protosil confería protección a los ratones frente a infección estreptocócica sistémica y tenía efectos curativos en los pacientes afectados por estos tipos de infecciones. Se comprobó que el protosil se metaboliza en el interior del organismo para liberar p-aminobenceno sulfonamida o sulfanilamida, cuya actividad antibacteriana se confirmó más tarde. Estas observaciones relativas a la primera “sulfa” iniciaron una nueva era en medicina (Murray, P., *et al.*, 2006). Históricamente, la terapéutica antiinfecciosa moderna comienza con la síntesis de las sulfamidas (1936), ya que hasta entonces la quimioterapia se basaba en la acción de iones metálicos, tan nocivos para el agente infectante como para el organismo infectado (Mediavilla, A., *et al.*, 1997). En 1929 Alexander Fleming refirió por vez primera la inhibición de la multiplicación de los estafilococos por el moho *Penicillium*. Preparó un concentrado a partir de un cultivo de ese hongo y demostró la notable actividad y ausencia del primer antibiótico, la penicilina. En los años cuarenta y cincuenta del pasado siglo se descubrieron la estreptomina y las tetraciclinas, este hallazgo se siguió con rapidez de otros aminoglucósidos, penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, quinolonas y otros antimicrobianos (Murray, P., *et al.*, 2006).

La farmacología antiinfecciosa se caracteriza por analizar fármacos que han de actuar sobre células distintas de las del paciente, es decir se busca la eliminación del organismo infectante sin que, en lo posible, se lesionen las células infectadas (Seija, V. y Vignoli, R., 2003).

De acuerdo a la interacción germen-antibiótico: dichos fármacos se comportan de manera diversa: **Como bactericidas:** producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los antibióticos b-lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas. **Como bacteriostáticos:** inhiben el crecimiento bacteriano aunque el microorganismo permanece viable, el cual una vez suspendido el antibiótico, puede recuperarse y volver a multiplicarse. Pertenecen a

este grupo: tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincosaminas, sulfamidas y trimetoprima (Kohanski, M. *et al.*, 2010; Mediavilla, A., *et al.*, 1997).

Según el espectro de acción los antibióticos se clasifican en: **antibióticos de amplio espectro** ya que pueden inhibir una gran variedad de bacterias Gram (+) y Gram (-). **Antibiótico de espectro reducido** solo es activo contra determinados gérmenes. (Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P., *et al.*, 2006).

La combinación de antibióticos se puede usar para: 1) ampliar el espectro antibacteriano en el tratamiento empírico o en el tratamiento de infecciones mixtas; 2) prevenir la aparición de organismos resistentes durante el tratamiento; 3) obtener efecto bactericida sinérgico (Murray, P., *et al.*, 2006).

Clasificación de antibióticos según el mecanismo de acción:

Es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidora de la membrana citoplasmática, inhibidora de vías metabólicas (Kohanski, M. *et al.*, 2010; Seija, V. y Vignoli, R., 2003).

1.2.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular:

Antibióticos b-lactámicos: De origen natural o semisintético que poseen en su estructura un anillo betalactámico. Se clasifican en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P. *et al.*, 2006).

Penicilinas: Derivados de penicilina son fármacos cuyo compuesto básico es un ácido orgánico con un anillo B-lactámico obtenido a partir de cultivos de moho *Penicillium Phrysogenum* (Murray, P. *et al.*, 2006).

Tabla 1 Penicilinas

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de acción	Efectos adversos
-Penicilinas naturales (bencilpenicilina, penicilina G). -Fenoximetil penicilina (penicilina V).	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus beta hemolíticos</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Streptococcus grupo viridans</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Clostridium spp</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Actinomyces</i>	Inhibición de la síntesis de la pared celular.	Acción irritativa sobre el aparato digestivo y sobre el músculo o la vena, dependiendo de la vía por la que se administren, pudiendo causar flebitis o miositis. Su estructura favorece la aparición de hipersensibilidad: exantemas, edemas, hemólisis. Pueden producir shock anafiláctico.
-Penicilinas resistentes a penicilinasas: metilicina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina.	<i>Staphylococcus spp</i> metilicina sensibles		
Penicilinas de alto espectro: aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina); ureidopenicilina (piperacilina).	Igual que el anterior más <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> no productor de beta lactamasa, <i>Salmonella spp</i> , <i>E.coli</i> no productor de beta lactamasas, <i>Proteus mirabilis</i> . Más activas contra la hidrólisis por beta lactamasas producidas por enterobacterias.		
B-lactámico con inhibidor de B-lactamasa (ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ácido clavulónico, piperacilina/tazobactam)	Actividad similar a los B-lactámicos, mejor actividad frente a los estafilococos productores de B-lactamasa y algunos bacilos Gram-.		

(Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P., et al., 2006).

Cefalosporinas: De origen natural derivadas de productos de la fermentación del *Cephalosporium acremonium*. Las cefamicinas están íntimamente relacionadas con las cefalosporinas, pero contienen un radical de oxígeno en lugar de azufre en el anillo dihidrotiacina, lo que les confiere una estabilidad mayor frente a la hidrólisis por b-lactamasas (Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P. et al., 2006).

Tabla 2 Cefalosporinas

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de acción	Efectos adversos
De primera generación o espectro reducido: Cefadroxil, Cefazolina, Cefalexina, Cefradina	<i>Staphylococcus</i> spp meticilino sensibles <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella</i> spp	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Acción irritativa directa sobre el aparato digestivo y sobre el músculo o la vena, dependiendo de la vía por la que se administran, pudiendo causar flebitis o miositis. Su estructura favorece la aparición de manifestaciones de hipersensibilidad: exantemas, edemas, hemólisis, pueden producir shock anafiláctico.
De segunda generación o espectro ampliado: Cefaclor, cefuroxime	Agregan actividad sobre <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>		
De tercera generación ó cefamicinas de espectro ampliado: Cefotaxime, Ceftriaxona, Ceftazidime, Cefoperazona	Enterobacterias, <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> Agrega cobertura sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
De cuarta generación ó de máximo espectro: Cefepima, cefpiroma	Estable frente a beta lactámicas		

(Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P. *et al.*, 2006).

Carbapenémicos: Clase única de Betalactámicos que presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. Disponen de actividad ante prácticamente todos los grupos de microorganismos (Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P. *et al.*, 2006).

Monobactámicos: Antibióticos de espectro reducido únicamente activos frente a bacterias Gram (-) aerobias (Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P. *et al.*, 2006).

Tabla 3. Carbapenémicos y Monobactámicos

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Carbapenémicos: Imipenem, Meropenem, Ertapenem	<i>Staphylococcus</i> spp. sensibles a meticilina, <i>S. pneumoniae</i> y otros <i>Streptococcus</i> . enterobacterias y <i>Haemophilus</i> spp., incluyendo las cepas productoras de betalactamasas	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Los mismos efectos que las penicilinas y cefalosporinas.
Monobactámicos: aztreonam	Bacterias Gram negativas aerobias		

(Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P. *et al.*, 2006).

Gluco péptidos: Vancomicina y Teicoplanina. La Vancomicina es un antibiótico que se obtiene de *Streptomyces orientales*. Es bactericida de espectro reducido (solo actúa sobre bacterias Gram positivas). La Teicoplanina tiene una estructura y perfil de actividad similar a la Vancomicina (Finch, R. y Eliopoulos, G., 2005; Pigrau, C., 2003).

Tabla 4. Glucopéptidos

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Vancomicina y Teicoplanina	<i>Staphylococcus</i> meticilinorresistente de perfil hospitalario), <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos, <i>Corynebacterium JK</i> (multirresistente) y <i>Enterococcus</i> resistente a los betalactámicos o a aminoglucósidos. <i>Streptococcus</i> , corinebacterias, <i>Bacillus</i> spp., algunos actinomicetales y <i>Clostridium</i> spp. incluido <i>Clostridium difficile</i>	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Eritema y prurito en cuello y parte alta del tronco. Flebitis es frecuente cuando se administra por vía periférica. Puede producir trombopenia o neutropenia que desaparece al suspender el tratamiento

(Finch, R. y Eliopoulos, G., 2005; Pigrau, C., 2003).

Tabla 5. Otros Antibióticos inhibidores de la pared celular

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de Acción	Efectos adversos
POLIPÉPTIDOS: Bacitracina Polimixinas	<i>Staphylococcus</i> y <i>estreptococcus</i> .	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Nefrotóxicas
Isoniacida, etionamida, etambutol y cicloserina.	Infecciones por micobacterias	Inhibición de la síntesis de la pared celular.	

(Seija, V. y Vignoli, R., 2003; Murray, P. *et al.*, 2006).

1.2.2 Inhibición de la síntesis de proteínas

Aminoglucósidos: Se componen de amino azúcares unidos mediante enlaces glucósidicos a un anillo aminociclitol. Son sustancias producidas por los actinomicetos (bacterias) *Streptomyces* ssp. Y *Mycromonospora* ssp. (Hermann, T., 2007; Rodríguez-Alvarez, M. 2002).

Tabla 6. Aminoglucósidos y Aminociclitolos

ANTIBIÓTICO	ESPECTRO DE ACTIVIDAD	EFEECTO DE ACCIÓN	EFECTOS ADVERSOS
Aminoglucósidos: Estreptomina, kanamicina, gentamicina, trobamicina, amikacina.	<i>Klebsiella sp, Enterobacter aerogenes, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Francisella tularensis, Brucella abortus, Yersinia pestis, M. tuberculosis.</i>	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Ototóxico y Nefrotóxico.
Aminociclitol: espectinomina.	Activa frente a <i>Neisseria gonorrhoeae.</i>	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Ototóxico y Nefrotóxico.

(Hermann, T., 2007; Rodríguez-Alvarez, M., 2002).

Macrólidos: La estructura básica de estos antibióticos consta de un anillo de lactona macrocíclico unido a dos azúcares, desoxamina y cladinosa (Caballero, J. 2007; Zuckerman, JM., 2004).

Tabla 7. Macrólidos

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de acción	Reacciones adversas
Eritromicina, claritromicina, acitromicina.	<i>Clostridium, perfringens, Propionibacterium acnes, Corynebacterium diphtheriae, Bacillus anthracis, Listeria, Rhodococcus equii, Lactobacillus, Leuconostoc y Pediococcus Moraxella spp., Bordetella pertussis, Campylobacter jejuni, Neisseria spp., Haemophilus ducreyi, Gardnerella vaginalis, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia spp., Legionella spp., Borrelia burgdorferi, Coxiella burnetii)</i>	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Molestias gastrointestinales (dolor abdominal, Náuseas y vómitos). Reacciones ototóxicas están en relación con el uso Endovenoso.

(Caballero, J., 2007; Zuckerman, JM., 2004).

Tetraciclinas: Constituyen una familia de productos naturales y semisintéticos, derivados de diferentes especies de *Streptomyces spp.* Agentes bacteriostáticos,

poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados. (Murray, P. *et al.*, 2006; Vicente y Pérez-Trallero, E., 2003).

Tabla 8. Tetraciclinas

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Tetraciclina, Doxiciclina, Minociclina	<i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Nocardia spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio spp.</i> , <i>Brucella spp.</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Intolerancia gastrointestinal (náuseas, vómito, diarrea). Fotosensibilidad, Toxicidad del SNC. Insuficiencia renal y toxicidad hepática principalmente en mujeres embarazadas.

(Murray, P. *et al.*, 2006; Vicente y Pérez-Trallero, E., 2003)

Otros inhibidores de la síntesis de proteínas: Clindamicina y Cloranfenicol.

Tabla 9. Clindamicina y Cloranfenicol

Antibiótico	Espectro de actividad	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Lincosamida (clindamicina)	Estafilococos, Bacilos Gram (-) anaerobios.	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Alteraciones gastrointestinales, mal sabor de boca, erupciones cutáneas, reacciones alérgicas, dolor en el sitio de inyección, alteraciones hematológicas y colitis.
cloranfenicol	Espectro igual a las tetraciclinas.		Nauseas, vómito, diarrea, prurito anal, infecciones oportunistas, supresión de médula ósea, confusión y depresión, síndrome del niño gris.

(Murray, P. *et al.*, 2006; Artístil, P., 2001)

1.2.3 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Quinolonas: antibióticos sintéticos que constituyen una de las clases de antimicrobianos más utilizada. Tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. (Sarkozy, G., 2001; Alós, J., 2003).

Tabla 10. Quinolonas

Antibiótico	Espectro de acción	Mecanismo de acción	Efectos adversos
<p>Espectro reducido: Ácido nalidíxico.</p> <p>Amplio espectro: Ciprofloxacino, levofloxacino, ofloxacino.</p> <p>Espectro ampliado: Gatifloxacino, grepafloxacino, clinafloxacino, moxifloxacino.</p>	<p>Bacterias Gram -</p> <p>Bacterias Gram +</p> <p>Pseudomonas aeruginosa, Mycobacterium, tuberculosis</p>	<p>Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos</p>	<p>Efectos gastrointestinales:</p> <p>En el SNC: dolor de cabeza, mareos, somnolencia, insomnio, fatiga, agitación y temblores.</p> <p>Piel: exantema, Reacciones de fotosensibilidad y prurito, y rotura de tendones</p>

(Sarkozy, G., 2001; Alós, J., 2003)

Sulfonamidas: fármacos similares de forma estructural al ácido paraaminobenzoico. Son antimicrobianos de amplio espectro con propiedades bacteriostáticas y bactericidas. Fueron los primeros quimioterápicos. Ocupando hoy en día un lugar menor en el arsenal terapéutico del médico (Artistil, P., 2001)

Tabla 11. Sulfonamidas.

Antibióticos	Espectro de acción	Mecanismo de Acción	Efectos adversos.
<p>Sulfametoxazol, sulfisoxazol, sulfadiazina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfasalazina.</p>	<p><i>E.coli, Klebsiella, E. coli, Klebsiella, Salmonella, Shigella, y Enterobacter, Nocardias, Chlamydia, trachomatis y Ricketsias</i></p>	<p>Inhibición de ácidos nucleicos.</p>	<p>Alteraciones gastrointestinales: náuseas, vómito, anorexia y dolor abdominal.</p> <p>Reacciones hematológicas, erupción cutánea, rash, dermatitis exfoliativa y fotosensibilidad.</p>

(Artistil, P., 2001)

1.3 Restricción económica en población de bajos y muy bajos recursos.

La Organización Mundial de Salud (OMS) clasificó las enfermedades en tres grupos: 1.- enfermedades infecciosas, de la nutrición y de la reproducción; 2.- enfermedades no transmisibles; 3.- accidentes y violencias. Las enfermedades del primer grupo son denominadas enfermedades de rezago, porque son enfermedades prevenibles e incluso a bajo costo, también porque afectan a poblaciones pobres que tienen problemas de acceso a bienes y servicios básicos, donde destacan los servicios de salud. Estas enfermedades son responsables del 13% de muertes en el país, en municipios de alta y muy alta marginación contribuyen con el 21% de defunciones (programa nacional de salud. 2012). Las personas que viven en lugares precarios son más propensas a presentar enfermedades gastrointestinales, esto por la mala calidad del agua que se bebe, el mal manejo de desechos, por la falta de higiene personal y en el hogar por lo tanto son viviendas poco salubres. Algunas características de estas viviendas son que no cuentan con ningún sistema de drenaje, tampoco tienen servicio de recolección de basura, están construidas con muros de materiales poco durables u orgánicos y piso de tierra el cual aumenta la probabilidad de enfermedades infecciosas. Un buen porcentaje de viviendas habitadas por hogares pobres tienen como fuente principal de agua las llaves públicas o hidrantes, pipas, pozos o cuerpos de agua lo cual aumenta el riesgo de contraer enfermedades (Diagnóstico sobre la población en condiciones de pobreza. SEDESOL, 2010).

En las últimas décadas la frecuencia de las enfermedades infecciosas intestinales se redujo gracias a la ampliación de la infraestructura sanitaria y del acceso a agua potable, el uso de la terapia de rehidratación oral, la ampliación de las coberturas de vacunación y el incremento del acceso a servicios esenciales de salud. Sin embargo, las infecciones comunes siguen siendo un problema en algunos estados y en los municipios y localidades más pobres del país (Programa nacional de salud 2007-2012). Si se hace un análisis de las condiciones de vida de los pueblos indígenas se evidencia la desigualdad socioeconómica y marginación del desarrollo

que padecen estas poblaciones con respecto al resto de la población. A causa de los rezagos y vulnerabilidad en materia de salud del mundo indígena, continua siendo para ellos un problema el predominio de las enfermedades transmisibles, con elevada mortalidad infantil y materna, alta desnutrición especialmente en los estados del sur y sureste del país, además la persistencia de enfermedades residuales las cuales son ausentes en otros sectores de población (Estrategia de cooperación para el país. OMS/OPS, 2005).

Las cifras de mortalidad mundial en el 2005 en población pensionada, en países de altos ingresos fueron de 7000 muertes por enfermedades crónicas y 500 muertes por enfermedades infecciosas y la misma cifra fue causada por lesiones. En países de ingresos medios alto ocurrieron 3000 muertes por enfermedades crónicas, por enfermedades infecciosas y lesiones ocurrieron 500 muertes para cada una. En países de ingresos medios bajos ocurrieron 13000 muertes causadas por enfermedades crónicas, 2500 por enfermedades infecciosas y 2000 muertes causadas por lesiones. Para el caso de países de bajos ingresos hubo una cifra de 12000 muertes a causa de enfermedades crónicas, 14000 muertes debido a enfermedades infecciosas y solamente 2500 muertes por lesiones (Sandoval, L., 2010).

En el 2010, poco más de una tercera parte de la población de Puebla, Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Chiapas, Veracruz y Tlaxcala no tenía acceso a los servicios de salud. En el 2012 seis entidades (Estado de México, DF. Veracruz, Jalisco, Puebla y Michoacán) concentraron a poco más de la mitad total de carentes de servicios de salud en el país (Informe de pobreza en México, CONEVAL, 2012.)

Una línea de acción que se puede realizar para poder mejorar los servicios de salud en la población de escasos y muy escasos recursos, es promoviendo y apoyando el establecimiento de líneas de investigación y docencia relacionados con la medicina tradicional y además involucrando a indígenas o personas expertas en estos temas ((Estrategia de cooperación con el país. OMS/OPS, 2005).

1.4 Terapias alternas

Los países más pobres del mundo son los más necesitados de tratamientos baratos y eficaces para las enfermedades que los aquejan. La OMS estima que a una tercera parte de la población global le sigue faltando acceso periódico a medicinas esenciales. Las poblaciones de África, Asia y Latinoamérica utilizan la medicina tradicional (MT) para ayudarse a satisfacer sus necesidades sanitarias primarias. Además de ser accesible y asequible económicamente, la MT es también muy a menudo parte de un sistema más amplio de creencias y es considerada una parte integral de la vida diaria y del bienestar. La medicina tradicional comprende diversas prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias que incluyen plantas, animales y/o medicinas basadas en minerales (Medicina Tradicional-..., World Health Organization Geneva, 2002).

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también la relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevos fármacos que en algunos casos tiene un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos (Avello, L. y Cisternas, F., 2010).

2. Usos de Plantas Medicinales

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha tratado de mitigar sus dolencias y prolongar su vida. Este hecho se ha observado desde que existen registros históricos, de civilización en civilización, hasta nuestros días. Por lo tanto cuando el hombre sólo tenía a su disposición los recursos que el planeta le otorgaba, buscó en éstos las herramientas para disminuir el dolor físico y evitar la muerte. Dentro de estos recursos de la naturaleza que contribuyen hasta hoy en disminuir síntomas y prevenir enfermedades, destaca el reino vegetal (Avello, L. y Cisternas, F., 2010).

El tema de las plantas medicinales es quizá tan antiguo como el hombre mismo, y los conocimientos al respecto siempre han estado diseminados (Quesada, H., 2008). Fue así que cada región del mundo desarrolló su forma de curar a partir de

plantas medicinales, que es única y característica, puesto que se utilizaban especies endémicas de las regiones en cuestión. Con el tiempo estas terapias características locales pasaron a conformar la llamada medicina tradicional y al ser preservada por los pueblos originarios (Avello, L. y Cisternas, F., 2010).

Con la gran cantidad de estudios que se le han realizado a las plantas, se tiene el conocimiento que gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico, del cual sólo se conoce con éxito un tercio, considerando la variedad de especies existentes a nivel mundial y aquellas inexploradas hasta hoy, sin considerar aquellas especies ya extintas (Avello, L. y Cisternas, F., 2010). Estas plantas se pueden extraer de los bosques o de campos abiertos sean cultivados o no, como también de la orilla de las vías públicas o caminos; lo recomendable es domesticarlas y obtener de dichos sitios semillas, plántulas y estacones para poder cultivarlas en otro lugar (Quesada, H., 2008).

Aunque la medicina moderna está bien desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en vías de desarrollo todavía dependen de los profesionales tradicionales, las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria (López, S. y Cañellas, G., 2012).

2.1 Fitoterapia

La fitoterapia (del griego *fyton*, 'planta', 'vegetal' y *therapeia*, 'terapia'), conocida también como herbolaria (del latín *herba*, 'hierba') es la ciencia del uso extractivo de plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos, para prevención o tratamiento de patologías (López, S. y Cañellas, G., 2012). Esta pertenece al ámbito de la medicina y se relaciona estrechamente con la botánica y el estudio del metabolismo secundario vegetal, es ejercida por médicos y por fitoterapeutas (López, S. y Cañellas, G., 2012; Motaleb, M. *et al.*, 2011).

Plantas medicinales: cualquier planta que en una o más de sus partes (hojas, flores, corteza, raíz etc.) contienen sustancias que las hacen útiles para mejorar o

perjudicar la salud de las personas o los animales (Cruz, S., 2007; Lewington, A., 1993; Quesada, H., 2008.).

Preparaciones de las plantas para su uso medicinal:

Infusión: Para prepararla se vierte la droga en el agua caliente hasta el punto de ebullición, tapando y dejando en maceración durante unos 3-5 minutos. Se cuela, la solución resultante se consume, preferiblemente caliente. **Decocción:** Se vierte la cantidad adecuada de la droga en un recipiente con agua el agua caliente al punto de ebullición, se deja hervir de 2 a 5 min. Se apaga el fuego, se deja en maceración por 15 min. El líquido resultante se filtra y se consume preferible caliente. **Maceración:** colocar la planta previamente pesada en un recipiente con cantidad de agua necesaria a temperatura ambiente. Se deja reposar en un lugar fresco y oscuro de 12 a 24 horas. Se filtra el líquido resultante y se consume. **Zumos:** la planta fresca se tritura o prensa, después se filtra y se usa el líquido resultante. **Tinturas:** Se prepara dejando la planta ya sea desecada o fresca y triturada en alcohol, a temperatura ambiente, durante 2 o 3 días y consumir el líquido usualmente en gotas (López, L., 2002; Joy, P. *et al.*, 2001).

La fitoterapia utiliza matrices vegetales complejas, estas matrices las constituyen plantas enteras, partes de ellas (hojas, raíces, flores, frutos), y también productos de éstas, resultados de tratamientos directos con algún disolvente o medio que concentre los compuestos afines y facilite su administración, son los llamados extractos (Avello, L. y Cisternas, F., 2010).

2.2 Principios activos en plantas medicinales

Las plantas son laboratorios bioquímicos extraordinarios. A partir de sustancias tan simples como el agua, de la tierra y el bióxido de carbono del aire, son capaces de producir glucosa, devolviendo además oxígeno al aire. Las moléculas de glucosa se polimerizan para formar almidón o celulosa en las hojas de las plantas y al combinarse con las sales minerales y otros elementos del suelo que se absorben en la raíz darán lugar a la síntesis de lípidos, esencias, glucósidos, taninos, vitaminas, proteínas, alcaloides y otros principios activos (Cruz, S., 2007). No se

encuentran en estado puro en las mismas, sino en forma de complejos cuyos componentes se complementan y se refuerzan en su acción sobre el organismo (Quesada, H., 2008; Lewington, A., 1993). La concentración y calidad de estos principios dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad, entre otros. Por ejemplo se sabe que las plantas muy jóvenes o muy viejas tienen menor concentración de principios activos (Ocegeda, S. *et al.*, 2005).

Los principios activos se clasifican, según su estructura química, en grupos:

Heterósidos: Los glucósidos o Heterósidos son compuestos que están formados por 2 partes: una es un azúcar (ej. glucosa) y la otra de no-azúcar o aglicona. Son clasificados por las características de la parte no-azúcar como se describen a continuación: Antraquinónicos: Consisten en una molécula de azúcar unido a un derivado del antraceno. Se emplean como laxantes o purgantes; Cardiotónicos: A este grupo pertenecen una serie de principios activos que actúan directamente sobre el músculo cardíaco y por tanto ejercen su acción terapéutica en la insuficiencia cardíaca congestiva o en las alteraciones del ritmo cardíaco; Cianogénicos: Hay plantas que desprenden ácido cianhídrico (cianogénesis). Han sido causa de envenenamientos mortales. Pueden ser Anestésicos. Anti-espasmódicas. Hipotensoras; Cumarínicos: Antibacteriano, Anticoagulante, Protector solar. La cumarina es un aromatizante. Tienen propiedades vitamínicas, aumentan la resistencia de las paredes de capilares; Fenólicos: se utilizan como Febrífugas y antipiréticas; Flavónicos: Fragilidad capilar. Vitamina C; Ranunculósidos: Irritantes para la piel; Saponósidos: Hemolisis. Emolientes. Dermatitis. SULFURADOS: Antibióticos (López, S. y Cañellas, G., 2012; Paz, A., 2008).

Polifenoles: Tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar Heterósidos, también se pueden encontrar libres: Ácidos Fenólicos: Son aril-carboxílicos, con uno o más grupos OH en el arilo. Son antioxidantes, analgésicos, coleréticos, etc.; Cumarinas: Son benzo - α - pironas. Tienen en común una estructura química denominada cumarina; Flavonoides: son

los pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo y pirona o fenil cromona. Existen 6 clases principales, chalconas, flavonas, flavonoles, flavanoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, también existen dos más, las xantonas y las auronas; Lignanós: Resultan de la unión de 2 unidades del fenil propano (C6 – C3). Son empleados en terapia antitumoral; Taninos: sustancias polifenólicas hidrosolubles no nitrogenadas. Tienen propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas; Quinonas: Diketonas aromáticas procedentes de la oxidación de fenoles. Se dividen en varios grupos: Benzoquinonas, Naftoquinonas, Antracilinas, Antraquinonas (Scalbert, A. *et al.*, 2005; López, S y Cañellas, G., 2012; Paz, A., 2008).

Terpenoides (aceites esenciales): formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno (C5): Iridoides: compuestos monoterpénicos. Se encuentra en los vegetales en forma de heterósidos. Ha mostrado elevada eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cánceres; Lactonas: Sesquiterpénicas. Son responsables del sabor amargo de muchas drogas .Tienen actividad antibacteriana y antifúngica. Algunas producen dermatitis; Diterpénos: Un ejemplo típico es el caso del taxol. Se usa en el tratamiento de algunos cánceres; Saponinas: sustancias que tienen poder espumante en soluciones acuosas, son tensoactivos naturales. Poseen propiedades hemolíticas, La toxicidad se reduce administrándolas vía oral (Roberts, S., 2007. López, S. y Cañellas, G., 2012; Paz, A., 2008).

Alcaloides. Dentro de este grupo se encuentran sustancias tóxicas incluso a bajas dosis. Estimulan el sistema nervioso central y autónomo. Algunos actúan como estimulantes otros como inhibidores. Ejemplo la quinina con efecto antimalárico (Salinas P. y Bermúdez, M., 1999. López, S. y Cañellas, G., 2012; Paz, A. 2008).

Otros principios activos mucílagos y gomas: Son polisacáridos heterogéneos, formados por diferentes azúcares y en general llevan ácidos urónicos. Se caracterizan por formar disoluciones coloidales viscosas, geles en agua, ya que la absorben y se hinchan. Tienen propiedades antiinflamatorias, emolientes (ablandan), vulnerarias (cicatrizan), protectoras de las mucosas, antidiarreicas (bajas dosis), laxantes (altas dosis) y antibióticas (López, S. y Cañellas, G., 2012; Paz, A., 2008).

Estos principios activos presentan un equilibrio fisiológico dentro de la planta y el organismo, resultan más asimilables por el cuerpo y carecen de efectos nocivos (Quesada, H., 2008).

2.2.1 Péptidos antimicrobianos

Los seres vivos como las plantas y animales, desarrollaron la estrategia de sintetizar péptidos antimicrobianos, esto para sobrevivir ante la amenaza diaria del medio ambiente, representada por bacterias, hongos y virus (Villaruel, R. *et al.*, 2004). Estos péptidos, o polipéptidos, contienen menos de 200 aminoácidos y son producidos por diferentes tipos de células. La mayoría de los péptidos antimicrobianos son codificados por genes y se sintetizan en los ribosomas, aunque existen otros que son el resultado de metabolitos secundarios (por ejemplo, la lactoferrina) (Téllez, G. y Castaño, J., 2010). La característica principal entre ellos es la presencia o no de cisteína (Villaruel, R., *et al.*, 2004).

A pesar de su origen estos péptidos comparten similitudes funcionales y estructurales que les permiten ser clasificados, basándose en la estructura y ubicación de puentes sulfuro (Rivas, S., *et al.*, 2006). En la actualidad se conocen 5 grupos de PAM (péptidos antimicrobianos): 1) hélice-alfa, 2) alto contenido de cisteína, 3) hojas-Beta, 4) alto contenido de un aminoácido y 5) aminoácidos modificados (Montaño, P., 2002). A la fecha se han descrito cerca de 500 péptidos antimicrobianos provenientes de diversos organismos incluyendo humanos, plantas, invertebrados marinos, anfibios, peces microorganismos (Rivas, S., *et al.*, 2006).

Mecanismo de Acción:

Interacciones con la membrana: producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, generando inestabilidad en la membrana externa, sufriendo modificaciones en su conformación y produciendo daños en la membrana internamente; **Mecanismo de barril:** luego de interactuar con la membrana, los péptidos se orientan en forma perpendicular formando una empalizada con sus cadenas laterales hidrofóbicas que encaran el centro hidrofóbico de la membrana, creando un poro hidrofílico provocando pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de la membrana; **Mecanismo forma anular:** Se unen a la membrana, los lípidos se doblan formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos, ocurre desequilibrio osmótico. **Mecanismo de alfombra:** no se insertan en la membrana, forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causan un colapso en forma de micelio, provocando pérdida del citoplasma. **Mecanismo de agregado:** el péptido se une a la membrana, en una alta concentración, forma estructuras parecidas a los micelios, forman un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático (Téllez, G., *et al.*, 2010; Zasloff, M., 2002).

Las defensinas son uno de los tipos de péptidos antimicrobianos más estudiados, se dividen en dos familias de acuerdo con la ubicación de sus puentes disulfuro: alfa-defensinas y beta-defensinas. En los humanos existen diferentes tipos de secreción de las defensinas como se muestra en la (Figura 1), (Rivas, B., 2006).

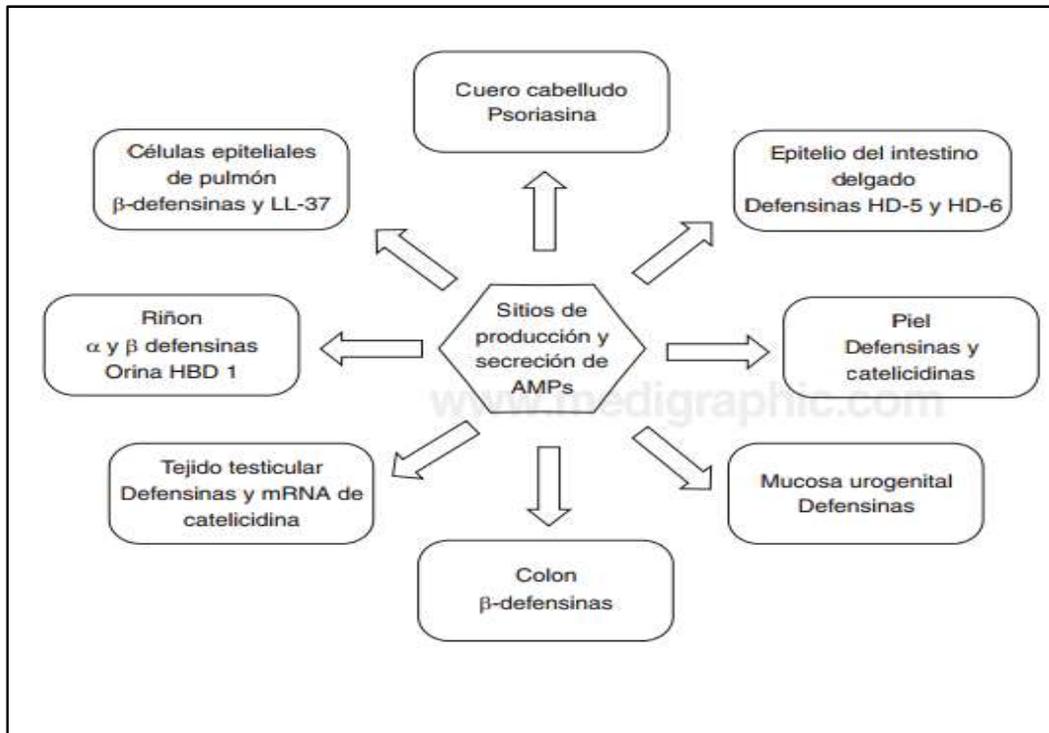


Figura 1 Sitios de secreción de los péptidos antimicrobianos en humanos. (Citado: Castañeda, J., et al, 2009).

2.2.2 Pigmentos con Actividad Antibacteriana. Mecanismo de acción.

Los pigmentos vegetales son los responsables de los colores brillantes de los tejidos vegetales. Son sustancias capaces de captar energía lumínica y de transformarla en energía química mediante la fotosíntesis. Los pigmentos se localizan en diferentes orgánulos según el tipo de molécula y su función. La clorofila se encuentra específicamente en los orgánulos vegetales llamados *cloroplastos*, en las membranas internas *otilacoides*. Asociados con la clorofila, existen también en los cloroplastos otra clase de pigmentos denominados “accesorios” que forman parte del complejo antena de la fotosíntesis, denominados carotenoides de color amarillo-anaranjado, de estos se derivan *las xantofilas* y *carotenos (oxocarotenoides)* de color amarillo. Estos pigmentos se alojan además en otros plástidos, dando el color característico de las flores o frutos (Toledo de Oliveira *et al.*, 2004; Schoefs, B., 2004).

Existe otro grupo de pigmentos vegetales los flavonoides, estos son pigmentos no nitrogenados, y se dividen en 4 grupos principales en función de sus características estructurales: 1) Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C; 2) Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C; 3) Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3; 4) Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Russo, R. y Speranza, M., 2006; Cartaya, O. y Reynaldo, I., 2001).

Según varios reportes, los flavonoides presentan actividad antibacteriana, ésta puede ser por la capacidad que tienen los pigmentos para unirse con azúcares, así que pueden actuar inhibiendo la pared celular bacteriana, ya que está constituida por gran cantidad de glicopéptidos (Cartaya, O. y Reynaldo, I., 2001).

3. MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*)

3.1 Descripción

La manzanilla es una planta de las más utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Su nombre científico es *Matricaria chamomilla*. Es una hierba anual que alcanza de 25 a 60 cm de altura, las hojas están divididas en dos o tres partes parecidas a encajes finos. Las cabezuelas son conjuntos de flores, con los centros amarillos y tienen florecillas de color blanco en la periferia con pétalos largos caídos hacia fuera (Figura 2). Originaria de Europa y el Oeste de Asia. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Es una planta silvestre, cultivada en huertos familiares, crece en terrenos de cultivo abandonados, asociada a vegetación perturbada en diferentes tipos de bosques. (Gupta, V., 2010; *Matricaria chamomilla*, 2008; Manzanilla, BIBLIOTECA DIGITAL de la medicina Tradicional Mexicana. UNAM.)



Figura 2. Manzanilla (*Matricaria chamomilla*). https://www.google.com.mx/?gws_rd=ssl#q=manzanilla

Principios activos: Ácidos: Alfa-bisabolol (flor), ascórbico, salicílico, cafeico, cáprico, gentísico, linoleico, palmítico, oleico, péctico (planta); Vitaminas: C (ácido ascórbico); Pigmentos: Luteolina, apigenina, cuarcetin (pigmentos amarillos); Alcoholes: farnesol, geraniol, borneol (planta); Mucílago; Azuleno; Chamazuleno; Farneseno; Matricarina; Patuletina; Jaceidina; Hiperosido; Axilarina; Colina; Azúcares: fructosa, galactosa (planta), glucosa (flor) (Riesco JM. *et al.*, 2005; *Matricaria chamomilla*, 2008; Gupta, V., 2010).

Entre los principios activos principales de la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) encontramos: Principio activo: Borneol, terpenos, alcanfor, etc. Se le utiliza en emplastos para aliviar torceduras en animales. Por su contenido de ácido salicílico, málico, fosfórico, taninos y resinas se le usa como antidiarreico y para curar la supuración de los ojos en conejos con mixtomatosis (Managua, 2005).

3.2 Clasificación Taxonómica.

Nombre común: Manzanilla. Nombre científico: *Matricaria chamomilla* L. (*syn. Matricaria. Recutita* L.; *Chamomilla recutita* L.). Familia botánica: Asteraceae (compositae). Centro de origen: Originaria de Europa (zona de los Balcanes), norte de África y Asia occidental (Manzanilla, BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM; Gómez, D., 2005.).

3.3 Propiedades Farmacológicas reportadas

La manzanilla en medicina tradicional: Se utiliza principalmente como relajante y para atender trastornos de carácter digestivo como vómito, diarrea, cólicos, dispepsia, empacho, reconfortar el estómago, estimular el hambre, cólico del recién nacido, gastritis nerviosa, indigestión, torzón, disentería. En padecimientos ginecobstétricos, se usa para la dilatación de la vagina durante el parto, dolores del embarazo, sacar el aire de la matriz (frialdad en la matriz), calmar algunos dolores menstruales. También está indicado en afecciones de los ojos, como inflamación, cansancio, irritación, lagañas, ardor, dolor por aire para lavado de ojos. Tiene usos en afecciones de las vías respiratorias ya que ayuda contra el resfrío, el catarro, de los bebés, tos asma, bronquitis, mormazón y para realizar lavados de nariz. Otros usos como desinfectante ligero, en caso de mal aliento, eliminar barros y espinillas, lavar heridas, fiebre, deshidratación de los niños, anginas calentura. Champú para aclarar el cabello. Además de ser una planta medicinal, es una planta ritual relacionada con la purificación y la salud (Pardo, M., 2006; Manzanilla, BIBLIOTECA DIGITAL de la medicina Tradicional Mexicana. UNAM).

Usos Farmacológicos: se ha confirmado experimentalmente la actividad antibiótica del extracto etanólico y del aceite esencial de la flor, y los microorganismos susceptibles son *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesenteroides*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. mutans*, *S. salivarum*, *Trichomona vaginalis*, y el hongo *Candida albicans*. Efecto antiespasmódico de los extractos acuosos y etanólico de la flor. El aceite esencial tiene actividad antiinflamatoria, también produce efecto relajante en musculo liso disminuyendo la peristalsis del intestino delgado, así mismo ejerce acción colerético (Matricaria chamomilla, 2008; Gupta, V., 2010)

4.- Contaminación en Sistemas de Riego

El agua, alimento esencial para los animales incluido el hombre, frecuentemente actúa como vehículo de transmisión de microorganismos entéricos y la materia fecal puede accidentalmente alcanzar una fuente de abastecimiento. Los microorganismos que abandonan el cuerpo con las excreciones suelen llegar a los alimentos o al agua, con lo cual pueden multiplicarse, y tienen asegurado el paso a las vías digestivas de otro huésped (Carpenter, P., 1977).

Por esto las aguas residuales utilizadas para los cultivos son una fuente de contaminación de las plantas, incluidas las comestibles lo que puede ocasionar una infección en el hombre. Algunos ejemplos de los microorganismos presentes en las aguas contaminadas que son patógenos y de origen entérico y parasitario intestinal transmiten enfermedades tales como salmonelosis (*Salmonella: Bacilos Gram -*), shigelosis (*Shigella: Bacilos Gram -*), cólera (*Vibrio cholerae: bacilos Gram -*), amebiasis (*Entamoeba histolytica: Amebas*), alteraciones gastrointestinales (*Aeromonas mesófilas, Helicobacter pylori, Campylobacter: Bacilos Gram -, pequeños en forma de coma*); giardiasis (*Giardia lamblia: amebas*), criptosporidiosis (*Cryptosporidium: Protozoos intestinales*), esquistosomiasis (*Schistosoma*), desórdenes Hepáticos (virus de hepatitis), etc., (Apella, M. y Araujo, Z., 2006).

Se hace énfasis de un grupo de estos microorganismos: las bacterias coliformes que corresponden a la flora normal del suelo, vegetación y agua. Estas pertenecen al grupo de las Enterobacterias las cuales tienen la capacidad de colonizar el interior de las plantas y desarrollarse como patógenos oportunistas. Este grupo de Enterobacterias posee resistencia a antibióticos y sobreviven por largo tiempo en el suelo. Los géneros bacterianos: *Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Citrobacter* y *Proteus* todos Bacilos Gram -, son los más comunes encontrados en el interior de las plantas (Pérez, S., 2012).

También se puede encontrar otro grupo de bacterias que pueden contaminar las plantas por medio del suelo, aire y riego con aguas residuales, los enterococos como su nombre lo dice son entéricos, cocos Gram positivos se disponen en parejas

y en cadenas cortas, colonizan el aparato digestivo de los humanos y animales, de los más importantes encontramos a los *E. faecalis* y *E. faecium*. Relativos a las heces (Murray, R. *et al.*, 2006).

Por último cabe mencionar otro grupo de bacterias contaminantes de las plantas los *Bacillus*: Bacilos Gram positivos presentes prácticamente en todos los ambientes, las personas de riesgo son las que consumen comida contaminada con la bacteria (ej. vegetales), de los más comunes de estos microorganismos tenemos a *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* (Pérez, S., 2012).

La mayoría de las bacterias mencionadas anteriormente pertenecen a la flora normal animal o humana. Se denomina microbiota normal, flora normal o flora nativa al conjunto de microorganismos que viven de forma habitual en un cuerpo sano. Los lugares donde se encuentran pueden ser muy variados y en ellos desarrollan tareas beneficiosas para el ecosistema general del cuerpo. Estas tareas incluyen la participación en los procesos de digestión de alimentos y de síntesis de vitaminas en el intestino, la producción del pH ácido de la vagina o la protección competitiva frente a patógenos (Murray, R. *et al.*, 2006).

Una técnica para diferenciar las bacterias Gram negativas de las Gram positivas es con una tinción, que además nos ayuda a observar la morfología (bacilos o cocos). En esta técnica consiste en: fijación de la muestra en un portaobjetos de cristal, después se expone a cristal violeta y se agrega yodo para formar un complejo con el pigmento principal. Una vez retirados los reactivos anteriores se realiza la decoloración con alcohol o acetona, las Bacterias Gram positivas retienen el complejo, mientras que los microorganismos Gram negativos lo pierden; se añade Safranina como colorante de contraste, que es retenido por los microorganismos Gram negativos, una vez secos los frotis se observan al microscopio, con el objetivo de 100x con una gota de aceite de inmersión (Murray, R. *et al.*, 2006).

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta. Esta situación ha originado una preocupación creciente por la biodiversidad y por el estado natural de las plantas y árboles con propiedades curativas. Actualmente, el deterioro del ambiente causado por la deforestación, el uso indiscriminado de agroquímicos, la contaminación del aire y del agua y otros factores están agravando las condiciones ecológicas donde crecen miles de especies con potencial medicinal (Quesada, A., 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

Hoy México enfrenta una compleja agenda de salud pública. Sufre todavía enfermedades del subdesarrollo, como las asociadas a padecimientos infecciosos, entre los cuales destacan las infecciones gastrointestinales, concentradas principalmente en los lugares más pobres, donde en general la salud tiende a ser más precaria y el acceso a servicios de salud es más limitado (Diagnóstico sobre la población..., SEDESOL, 2010). Por este motivo es de suma importancia recurrir a terapias alternativas, ya que estas se encuentran al alcance de la población socioeconómica de más bajos recursos (Avello, M. *et al.*, 2010).

Una muy buena opción es la utilización de plantas medicinales, ya que estas resultan ser muy económicas. En México alrededor de 4000 especies de plantas con flores tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa (Ocegueda, S., 2005), la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) es una planta la cual se usa para el tratamiento de diarreas, infecciones oculares y cutáneas, (Pardo, M., 2006; Manzanilla, BIBLIOTECA DIGITAL de la medicina Tradicional Mexicana. UNAM).

Así que un estudio sobre el efecto de extractos crudos, pigmentos acetónicos y alcohólicos de esta planta, sobre su actividad antibacteriana puede ser una alternativa para tratar infecciones gastrointestinales en la población de bajos recursos. Ya que es una planta que puede ser silvestre o cultivada, es fácil de que esté al alcance de la población de bajos recursos. Además que es muy común en la medicina tradicional. Si se realiza un estudio a fondo de sus extractos se pueden determinar qué componentes son los que poseen el efecto antibacteriano y así dar pie a un nuevo antibiótico que sea fácil de elaborar, por lo tanto tenga un bajo costo y esté al alcance de zonas de bajos y muy bajos recursos y así combatir las enfermedades gastrointestinales y cutáneas.

III. HIPÓTESIS

Los extractos de hojas y flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) presentaran actividad antibacteriana contra bacterias causantes de las infecciones gastrointestinales y cutáneas.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad anti-bacteriana de extractos de hojas y de flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el grado de contaminación de muestras de extractos crudos de hojas y de flores de manzanilla
- Evaluación de contaminación de tés comerciales (bolsa)
- Evaluar el efecto antibacteriano contra cepas ATCC de EC, FSP y pigmentos acetónicos y alcohólicos de hojas de manzanilla
- Evaluar el efecto antibacteriano contra cepas ATCC de EC, FSP y pigmentos acetónicos y alcohólicos de flores de manzanilla
- Obtener la Concentración mínima inhibitoria de los extractos analizados y compararlo con los antibióticos comerciales.

VI. MATERIAL

-Extracto crudo de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

-Pigmentos acetónicos y alcohólicos de hoja y flor de Manzanilla.

-Fracción sin pigmentos de hojas y flores de Manzanilla

-Medios Selectivos

- Agar Mueller Hinton.

-Caldo Nutritivo

Bacterias

Gram (+): *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644;

Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli enterotoxigénica* (ETEC) s/n, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* s/n, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

-Antibióticos: Penicilina, Ciprofloxacino y Gentamicina.

-Reactivos de grado analítico.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Extracto Crudo de Hojas de Manzanilla (ECHM): Se separaron las hojas de los tallos de la planta, se limpiaron con un algodón bañado con alcohol al 70%, de estas hojas se pesaron 50 g, seguido de una desinfección con solución de yodo al 5%. Se homogenizó esta cantidad en un mortero con pistilo agregando agua esterilizada en caso necesario, una vez que está homogenizado se separó la fase líquida de la sólida con ayuda de un colador, se centrifugó el líquido a 3000 rpm por 15 min. Obteniendo sobrenadante el cual se llama extracto crudo, del cual se realizaron diluciones (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) y conservando estas en refrigeración o en hielo. Para obtener el Extracto crudo de flor de Manzanilla (ECFM) se realizó el mismo método que para el ECHM. Excepto la limpieza con algodón y alcohol al 70%.

7.2 Pigmentos Acetónicos de hoja de Manzanilla (PACHM): Se separaron las hojas del tallo, se sanitizaron con un algodón bañado en alcohol al 70%, una vez secas se les realizaron lavados de acetona cada 8 días conservando éstos en refrigeración, se realizaron los lavados necesarios hasta que las hojas perdieron la coloración verde. Los lavados se llevaron a destilación simple para separar los pigmentos del solvente. Los pigmentos se concentraron en baño María, para utilizar una concentración de 4 mg/ml. Se utilizó el mismo método para obtener los pigmentos de flor de manzanilla (PACFM).

7.3 Pigmentos Alcohólicos de hoja de Manzanilla (PALHM): Una vez que se terminó de realizar los lavados de acetona. Para la extracción de estos pigmentos alcohólicos se siguió el mismo procedimiento utilizado para la extracción de pigmentos acetónicos. Se utilizó el mismo método para obtener los pigmentos alcohólicos de flor de manzanilla (PALFM).

7.4 Fracción sin Pigmentos de hoja de Manzanilla (FSPHM): Después de los lavados de acetona y alcohol la hoja se secó a temperatura ambiente hasta que perdió totalmente la humedad. Se pesaron 50 g, agregando agua esterilizada en un

volumen considerado para completa humectación, se dejó reposando por 24 horas, y se procedió a homogenizar en un mortero con pistilo, una vez homogenizado se separó la fase líquida de la sólida con ayuda de un colador, se centrifugó el líquido 3000 rpm por 15 min. Obteniendo el sobrenadante el cual se llama extracto de fracción sin pigmentos, del cual se realizaron diluciones (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) y se conservaron en refrigeración o en hielo. Se siguió el mismo método para preparar el extracto de fracción sin pigmentos de flor de manzanilla (FSPFM).

7.5 Infusión: Para prepararla se vierte la planta en el agua caliente hasta punto de ebullición, tapando y dejando en reposo de 3-5 minutos. Se filtra la solución resultante se consume, preferiblemente caliente.

7.6 Tinción Gram: En un porta objetos se colocó una gota de solución salina, en ella se diluyó un pequeño inóculo de la bacteria, dejando secar a temperatura ambiente, una vez seca, se fijó al calor, se cubrió el frotis con cristal violeta dejando actuar por un minuto, se retiró el exceso y se añadió solución yodo-lugol (mordente) dejando actuar por un minuto, se lavó con abundante agua, se añadió el decolorante alcohol/acetona 1/1 durante 5 segundos, se lava con abundante agua y se agregó safranina (colorante de contraste) dejando actuar durante un minuto, se lavó el exceso de colorante con abundante agua, se dejó secar a temperatura ambiente y se observó al microscopio con el objetivo 100 X con aceite de inmersión (Pelczar y Reid, 1980).

7.7 Agar Mueller Hinton: Se suspendieron 38g por litro de agua destilada. Una vez disuelto se esterilizó a 121 °C, 15 lb por 15 min. Enfriando a 40-45°C. Para poder verter asépticamente 20 ml de medio en cada placa petri, solidificando y secando el medio antes de realizar antibiogramas.

7.8 Agar Mac Conkey, Agar Sal y Manitol, Agar Sangre, Agar SS: Utilizando la cantidad que indica el frasco de cada medio, y el mismo método de esterilización que para el Agar Mueller Hinton, excepto para el Agar SS el cual no se esteriliza en las mismas condiciones.

7.9 Caldo Nutritivo: Suspendiendo 22g por litro de agua destilada, agregando un volumen de 5ml en tubos de rosca, para esterilizar a 121 °C, 15 lb por 15 min. atemperando antes de crecer las bacterias.

7.10 Escala de McFarland: Este estándar se prepara con 0.1 ml de una solución de cloruro de bario anhidro al 1% con 9.9 ml de una solución de ácido sulfúrico al 1%. La turbidez obtenida es la escala 0.5 descrita por McFarland (McFarland J. 1907) la cual equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC (Bernal, M., Guzmán, M., 1984).

7.11 Preparación del Inóculo: Se tomaron de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas de incubación y se sembraron en 5 ml de caldo nutritivo, e incubaron en la estufa a 35°C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ bacterias). Para esto se realizó lectura de absorbancia a 625 nm, considerando un rango de 0.06 a 0.1 de absorbancia (Picazo, J. et al., 2000).

7.12 Dilución de pigmentos en DMSO: la dilución de los pigmentos se realizó a una concentración de 4 mg por mililitro de DMSO, es uno de los solventes orgánicos más fuertes, efectivo para una amplia variedad de materiales orgánicos entre los que figuran muchos polímeros, es miscible con agua y la mayoría de líquidos orgánicos, además le brinda una gran estabilidad a los pigmentos.

7.13 Cuantificación de proteínas (Método de Bradford): Para este ensayo se realizó una curva patrón, utilizando una disolución madre de Albumina Sérica Bovina (BSA) de 0-20 mg/ml. También se utilizó un colorante de Coomasie (rojo), al reaccionar con las proteínas vira a color azul, Este colorante se une selectivamente a los aminoácidos arginina y lisina de las cadenas polipeptídicas y posteriormente, se lee en un espectrofotómetro de absorción a una longitud de onda de 595 nm (Bradford MM, 1976), se interpolan las absorbancias de las muestras en la curva patrón para determinar la concentración de las muestras.

7.14 Estandarización del antibiótico: Debido a que la concentraciones de los antibióticos utilizados es muy grande, se realizaron diluciones para obtener en los

antibiogramas halos de inhibición de 5 mm de diámetro, y así hacer una mejor comparación con los halos obtenidos de los diferentes extractos de la Manzanilla. Del ciprofloxacino se partió de una concentración de 700 mg/ 5ml y se diluyó de 1:1 hasta 1:8196 (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028), Penicilina se partió de una concentración de 500mg/2 ml se diluyó de 1:1 a 1:256 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543). Gentamicina con una concentración de 80 mg/2ml, se diluyó 1:128 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), y 1:256 (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli enterotoxigenica* s/n, *Shigella sonnei* s/n, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579).

7.15. Antibiograma: Utilizar una suspensión de cada bacteria en caldo nutritivo, con una turbidez equivalente a escala 0.5 McFarland. Para inoculación en un área estéril con ayuda de un mechero, sumergir un hisopo estéril en el caldo, eliminar exceso, frotar hisopo sobre superficie del medio de cultivo en placa. Repetir operación varias veces sucesivas rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo. Inocular un tipo de bacteria por placa. Colocar sobre el agar, con ayuda de pinzas esterilizadas, 5 discos de papel filtro esterilizados, 4 con las correspondientes diluciones del Extracto crudo, Fracción sin pigmentos, pigmentos acetónicos y alcohólicos (25 microlitros cada uno), y uno con buffer (control negativo) todos se colocan en círculo a 15 mm de la pared de la caja y 30mm entre ellos. En el centro se coloca otro disco con 25 microlitros del antibiótico al cual es sensible dicha bacteria (control positivo). Incubar a 35-37°C por 12-24 horas. Con una regla milimetrada medir el diámetro de la zona de inhibición, desde el exterior de la caja sin quitar la tapa. Se interpretaron los resultados, como se partió de una concentración conocida y se realizaron diluciones de esta, se determinó la concentración inhibitoria mínima a la cual mostraron sensibilidad las diferentes cepas. (Bauer, et al., 1966).

7.16 Evaluación del efecto Bacteriostático o Bactericida de los Extractos de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*): Para este procedimiento se utilizó el método de Courvalin *et al* (2006). Tanto para los extractos crudos como para los pigmentos de hoja y flor se prepararon muestras para cuatro diferentes diluciones (1:1, 1:2, 1:4 y 1:8) agregando 1 ml de cada dilución a 9 ml de caldo estéril MH que contiene bacterias en una concentración (1×10^7 UFC/ml) respectivamente. Se preparó un control positivo que contiene 1ml de bacterias en 9 ml de caldo estéril MH, y dos controles negativos, uno que contiene 10 ml de caldo estéril MH y el otro que contiene 1 ml de muestra en 9 ml de caldo estéril MH. A Cada una de las preparaciones anteriores se les midió la absorbancia a 625 nm a los tiempos (0, 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 24 h). Y realizando la comparación de absorbancias.

7.17 Análisis Estadístico: Realizar el análisis de datos, por medio de estadística descriptiva donde se utilizaron medidas de tendencia central como la media (\bar{X}), desviación estándar (S) y error estándar (E.E). Asimismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una línea), de múltiples comparaciones de tuckey.

VIII RESULTADOS

8.1 Identificación de la Morfología colonial y microscópica de las Bacterias ATCC.

A cada una de las diez cepas ATCC se les realizaron pruebas de identificación de morfología colonial o macroscópica por medio de aislados en medios selectivos, y morfología microscópica a través de una tinción Gram. Obteniendo los siguientes resultados.

Para el caso de las tres cepas de *E. coli* ATCC 25922, 27543 Y ETEC s/n. se realizó el sembrado por cuadrantes en cajas con medio MacConkey. Después de incubarlas por 24 horas a 37°C se observaron las características de su morfología colonial, la cual corresponde a colonias aisladas, circulares, convexas, bordes redondeados, y con una coloración rosada. A este sembrado se le realizó una Tinción de Gram en la cual al observar el frotis con el objetivo 100x se encontraron pequeños bacilos o cocobacilos Gram negativos (coloración roja). Como se muestra en las figuras (3,4y 5).

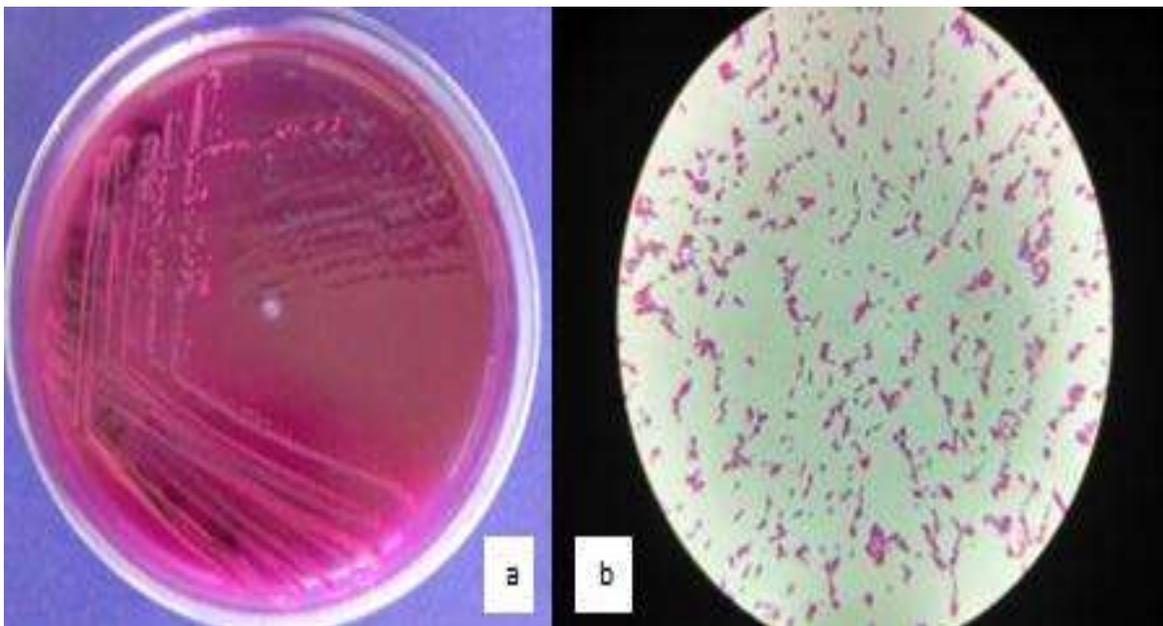


Figura 3. a) Morfología colonial de *E. coli* ATCC 25922 en medio MacConkey. b) morfología microscópica de *E. coli* ATCC 25922 observada en una tinción de Gram (magnificación 100x).

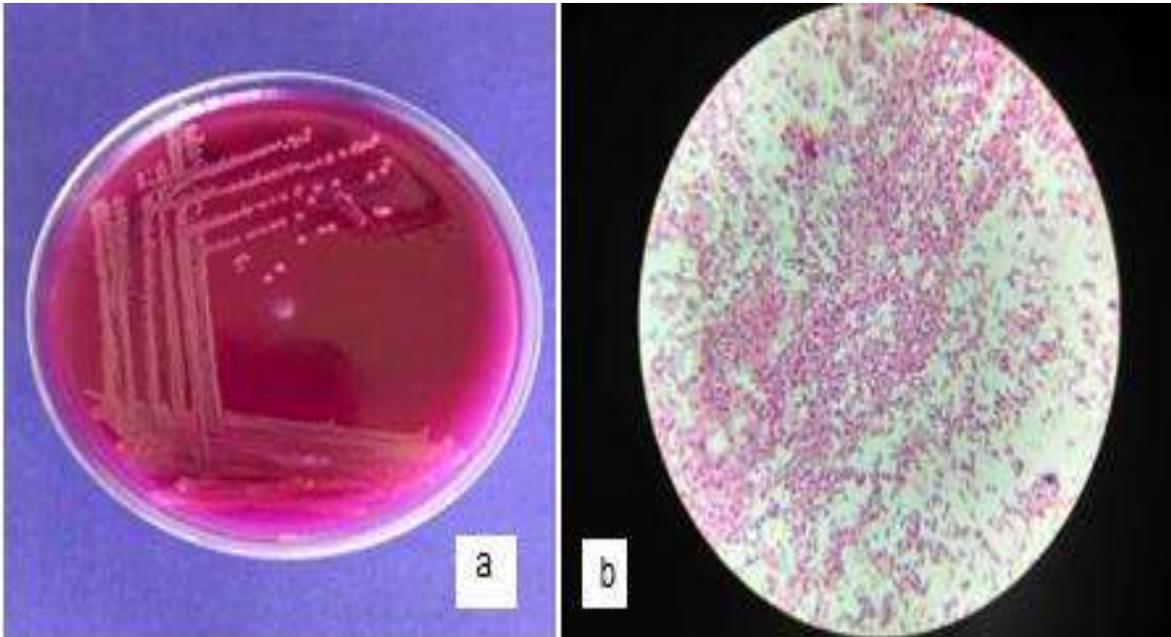


Figura 4 . a) Morfología colonial de *E. coli* ATCC 27543 en medio MacConkey. b) Morfología microscópica de *E. coli* ATCC 27543 observada en una tinción de Gram (magnificación 100x).

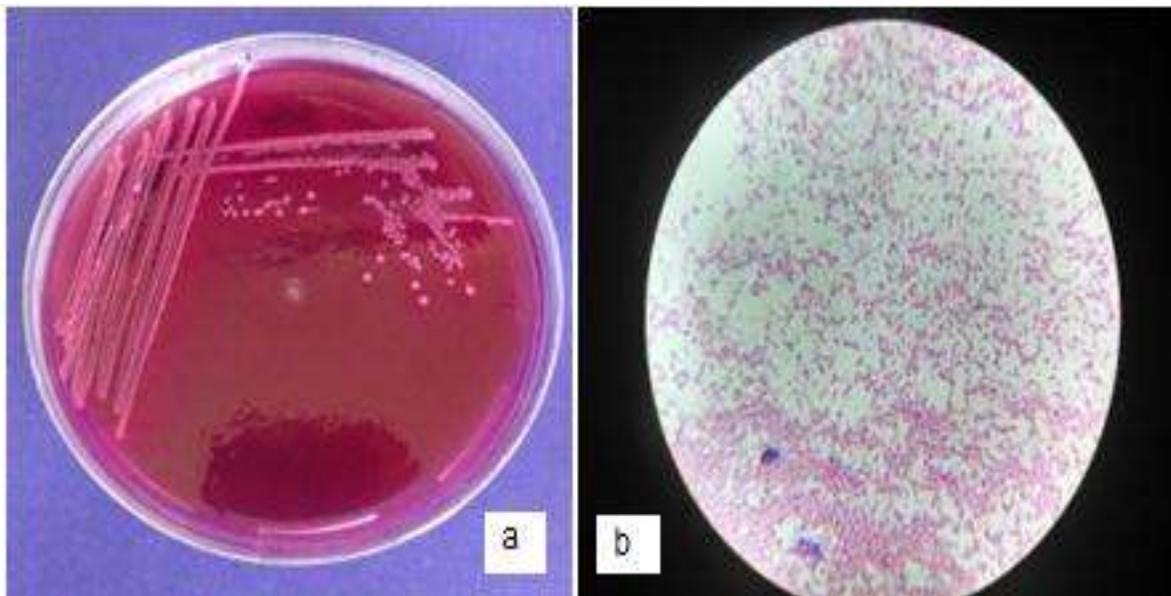


Figura 5. a) Morfología colonial de *E. coli* enterotoxigenica (ETEC) s/n en medio MacConkey. b) Morfología microscópica de *E. coli* enterotoxigenica (ETEC) s/n observada en una tinción de Gram (magnificación 100x).

Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 y ATCC 25923, en medio de sal y Manitol, la morfología colonial observada fue en forma de colonias pequeñas, definidas, lisas, convexas con un color amarillo brillante. En la morfología microscópica observada en el frotis de la tinción de Gram se encontraron cocos Gram positivo (color azul), agrupados en forma de racimo de uvas (figura 6 y 7).

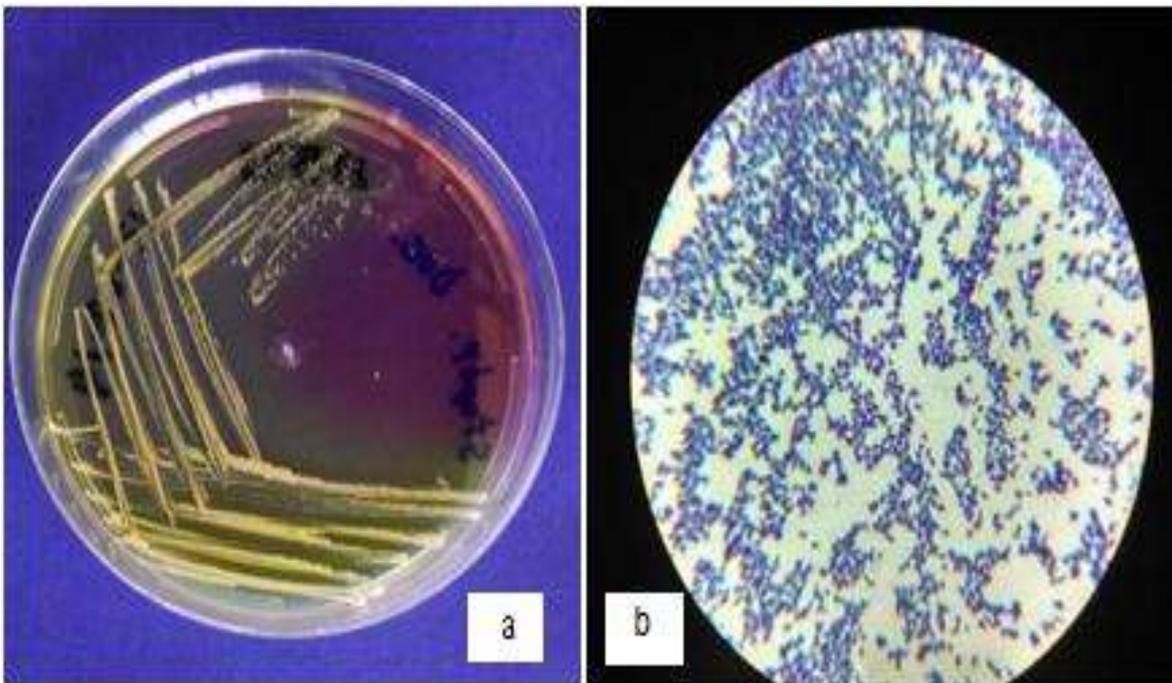


Figura 6 a) Morfología colonial de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 en medio Sal y manitol. b) Morfología microscópica de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 observada en una tinción de Gram (magnificación 100x)

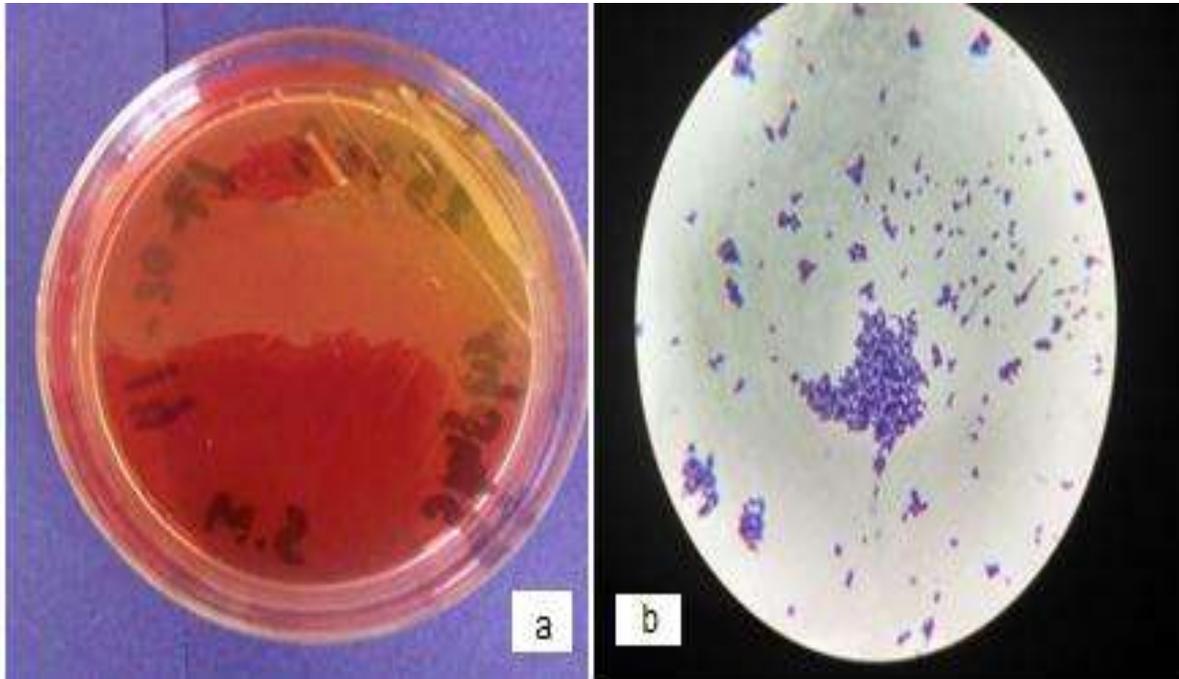


Figura 7. a) Morfología colonial de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en medio Sal y manitol. b) Morfología microscópica de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 observada en una tinción de Gram(magnificación 100x)

Para el análisis morfológico macroscópico de la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 el sembrado se realizó en agar sangre, la morfología que se observó fueron colonias pequeñas, lisas, color blanquecino opaco y con halo transparente alrededor de la colonia, y la morfología microscópica observada en la Tinción de Gram, fueron bacilos muy pequeños Gram negativos (coloración roja). Como se muestra en la (figura 8).

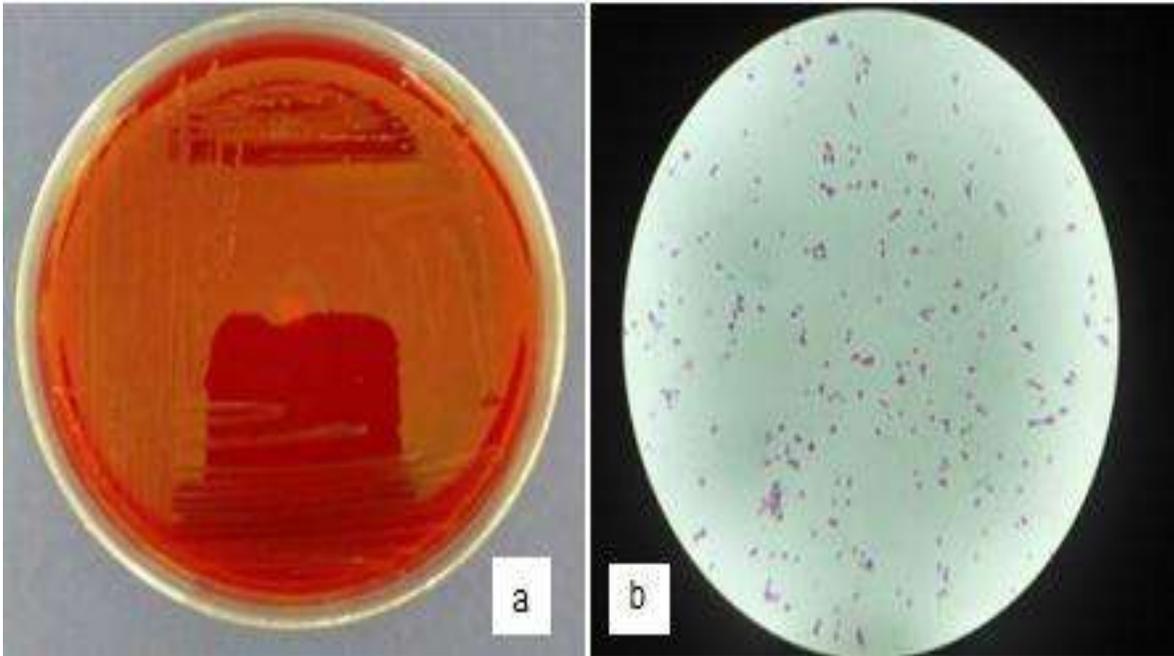


Figura 8 a) Morfología colonial de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en agar sangre. b) Morfología microscópica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 observada con la tinción de Gram (magnificación 100x).

La siembra de la cepa *Bacillus cereus* ATCC 14879 también se sembró en agar sangre y la morfología presentada fueron colonias de 3-8 mm de diámetro, de color gris a verde, y márgenes ondulados. Las colonias se extienden por el medio, con la presencia de un halo transparente alrededor de las colonias, en la tinción de Gram la morfología microscópica observada fueron Bacilos grandes con bordes redondeados, que forman cadenas cortas, Gram positivo (coloración azul). Como se observa en la (figura 9).

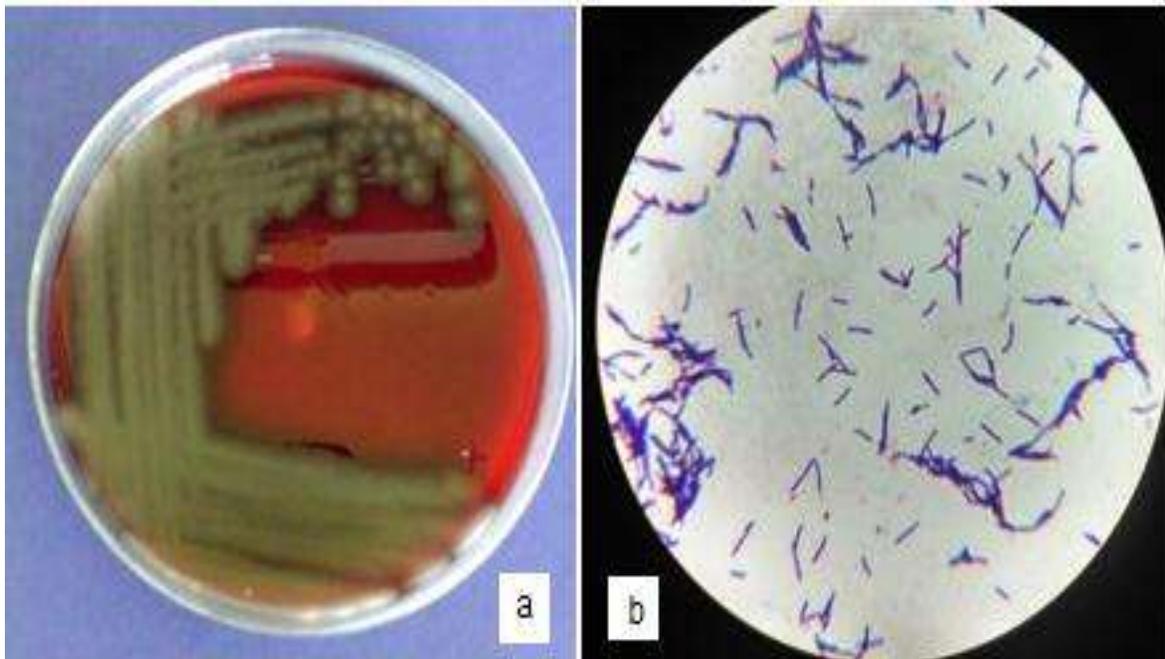


Figura 9 . a) Morfología colonial de *Bacillus cereus* ATCC 14879 en agar sangre. b) Morfología microscópica de *Bacillus cereus* ATCC 14879 observada en una tinción de Gram (magnificación 100x).

El agar sangre también se utilizó para sembrar y observar la morfología macroscópica de la bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, las cuales fueron colonias pequeñas grisáceas y presentando un halo transparente alrededor de la colonia. La morfología microscópica corresponde a bacilos pequeños Gram positivos (coloración azul). Como se muestra en la (figura 10).

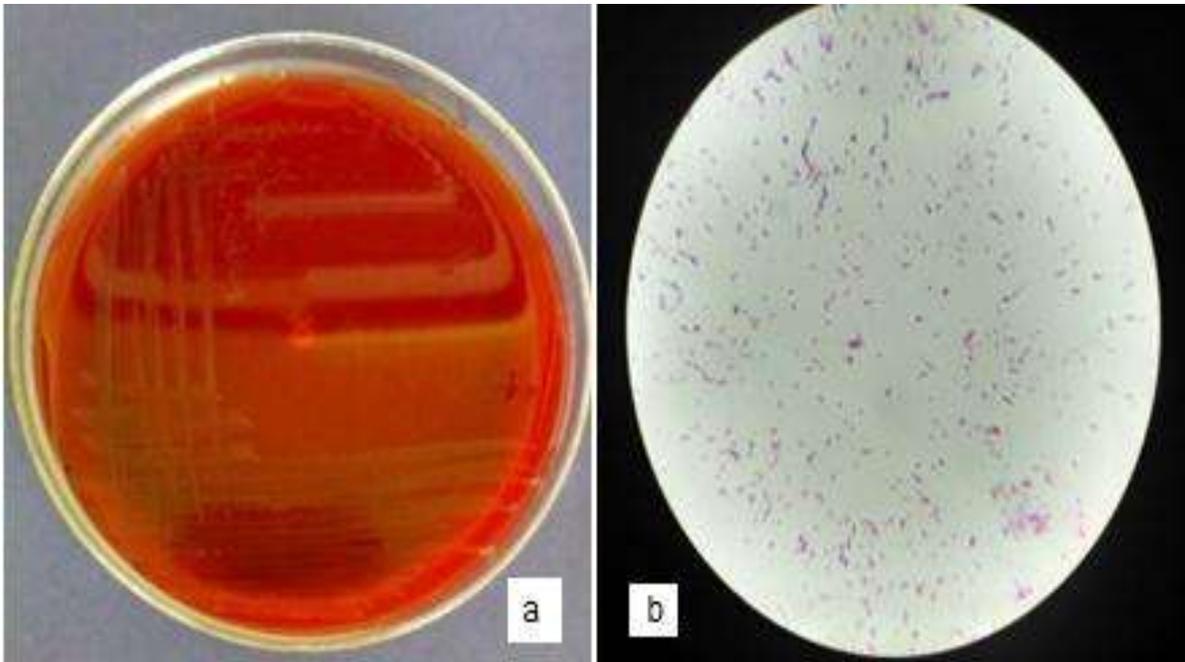


Figura 10. a) Morfología colonial de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 en agar sangre. b) morfología microscópica de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 Observada en una tinción de Gram (magnificación 100x).

La Bacteria *Shigella sonnei* S/N se sembró en medio SS (*Salmonella-Shigella*), en el cual tuvo crecimiento de colonias grandes, incoloras, transparentes e irregulares. Y en la morfología microscópica de esta bacteria en la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos (coloración roja). Como se muestra en la (figura 11).

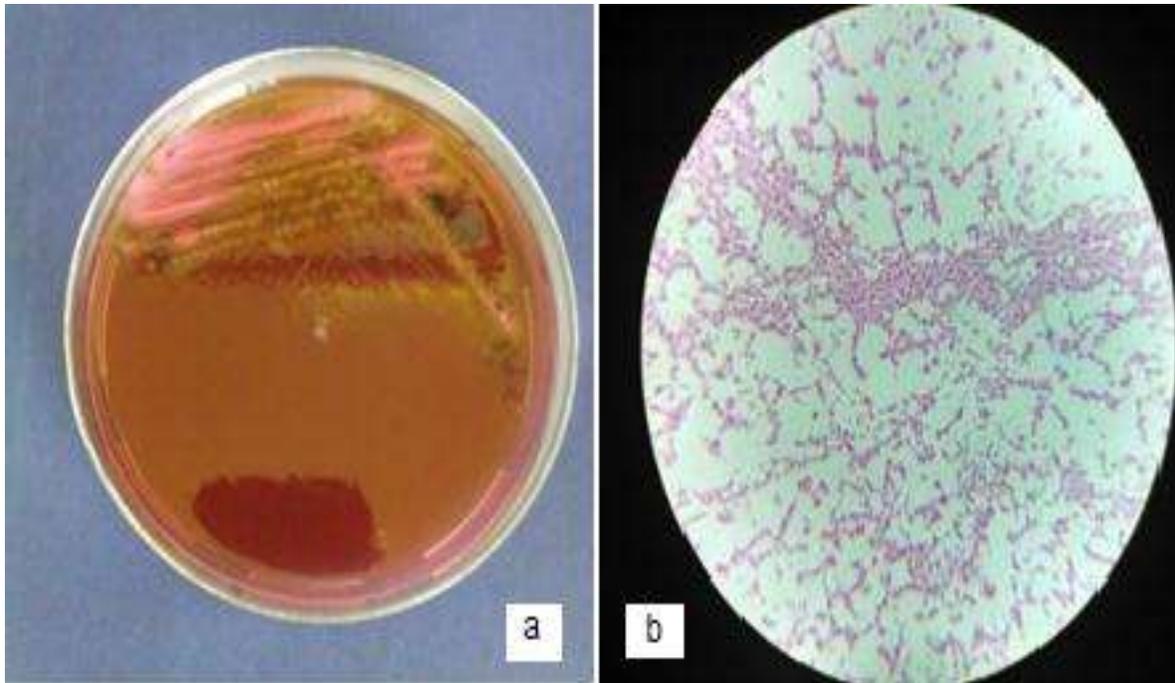


Figura 11. a) Morfología colonial de *Shigella sonnei* S/N en agar SS. b) Morfología microscópica de *Shigella sonnei* S/N observada en una tinción de Gram (magnificación 100x).

Por último la cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14027 también se sembró en medio SS (*Salmonella-Shigella*) en el cual crecieron colonias convexas, con un borde claro y centro negro las cuales le dan forma de un ojo de pescado. En la morfología microscópica se observaron pequeños bacilos Gram negativos (coloración roja). Como se muestra en la (figura 12).

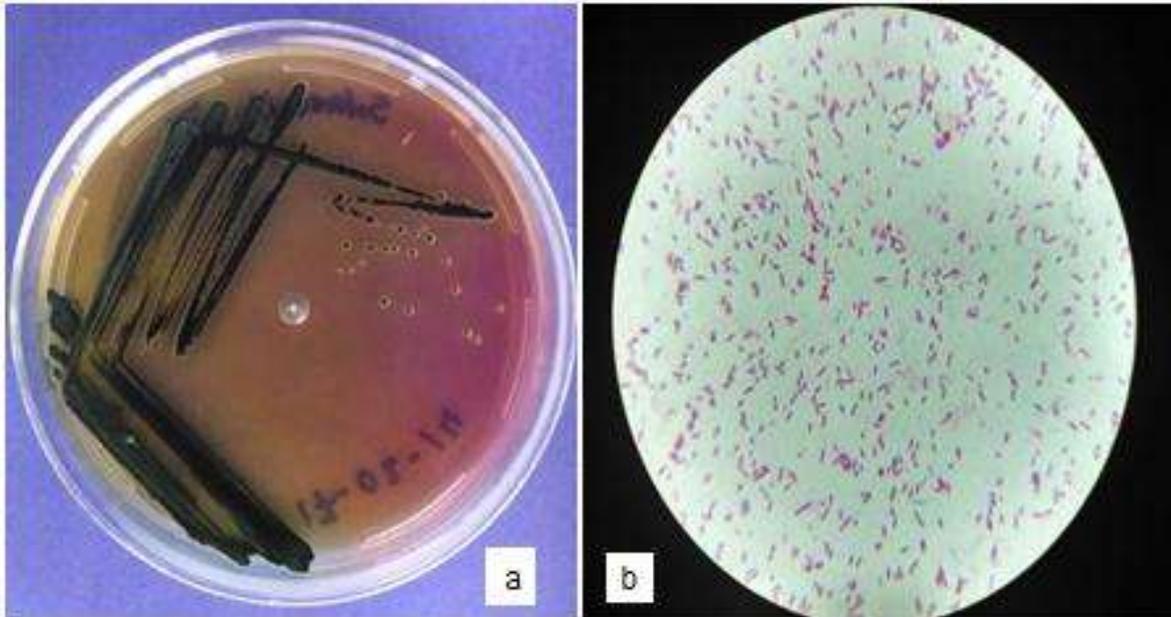


Figura 12. a) Morfología colonial de *Salmonella typhimurium* ATCC 14027 en agar SS. b) Morfología microscópica de *Salmonella typhimurium* ATCC 14027 observada en una tinción de Gram (magnificación 100x).

8.2 Evaluación del grado de contaminación de extractos crudos, té naturales de hoja y flor, y té comerciales de manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

Para la evaluación del grado de contaminación de la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), se realizaron sembrados masivos de los extractos crudos acuosos, y té naturales de Hojas y Flores, por separado de esta planta, en Agar Mueller Hinton, también se realizó esta evaluación a un té comercial (Bolsa) de Manzanilla. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En el sembrado masivo de extracto crudo de hoja de manzanilla, se cuantificó un crecimiento del 65% de colonias. Se realizó una tinción de Gram a estas colonias la cual se observó en el microscopio a 100X y se encontró la presencia de cocobacilos Gram negativos y algunos Gram positivos, como se muestra en la (figura 13).

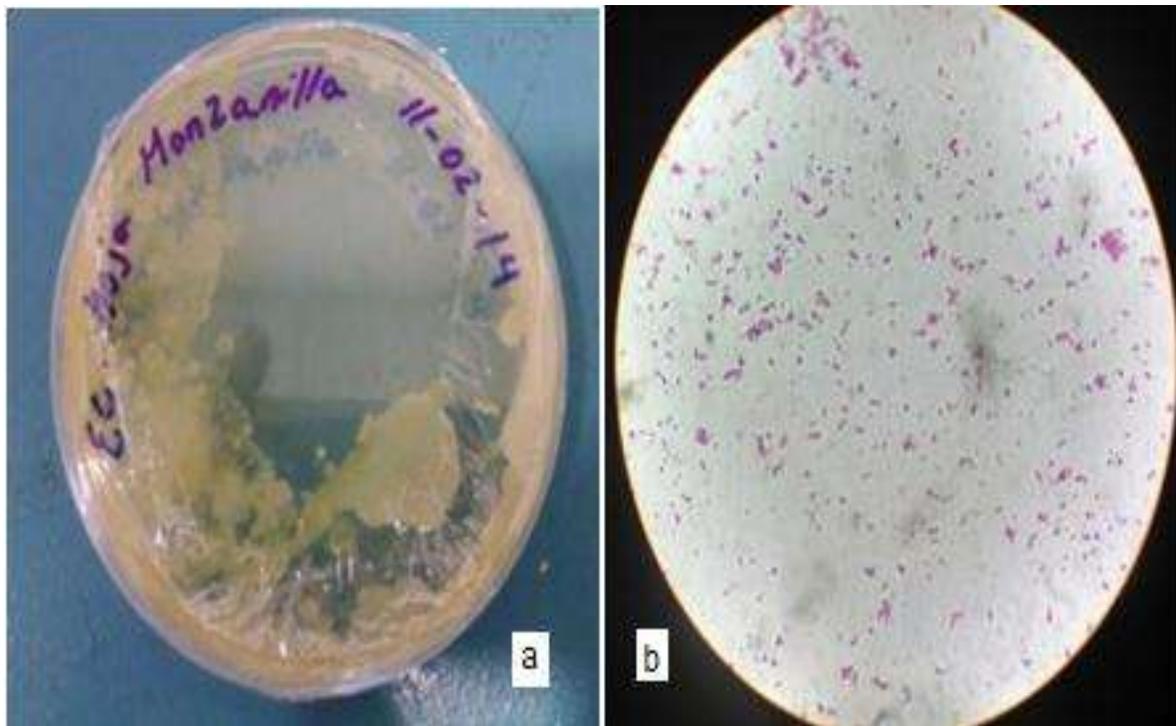


Figura 13. a) Sembrado masivo en agar Mueller Hinton de EC de Hoja de Manzanilla (macerado hoja fresca). b) Tinción de Gram de sembrado masivo de EC de hoja de Manzanilla (magnificación 100x).

En el sembrado masivo de EC de flor de manzanilla se obtuvo un crecimiento bacteriano más alto que en el sembrado de EC de Hoja con un 95%, en la Tinción de Gram también se observaron bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. Como se muestra en la (figura 14).

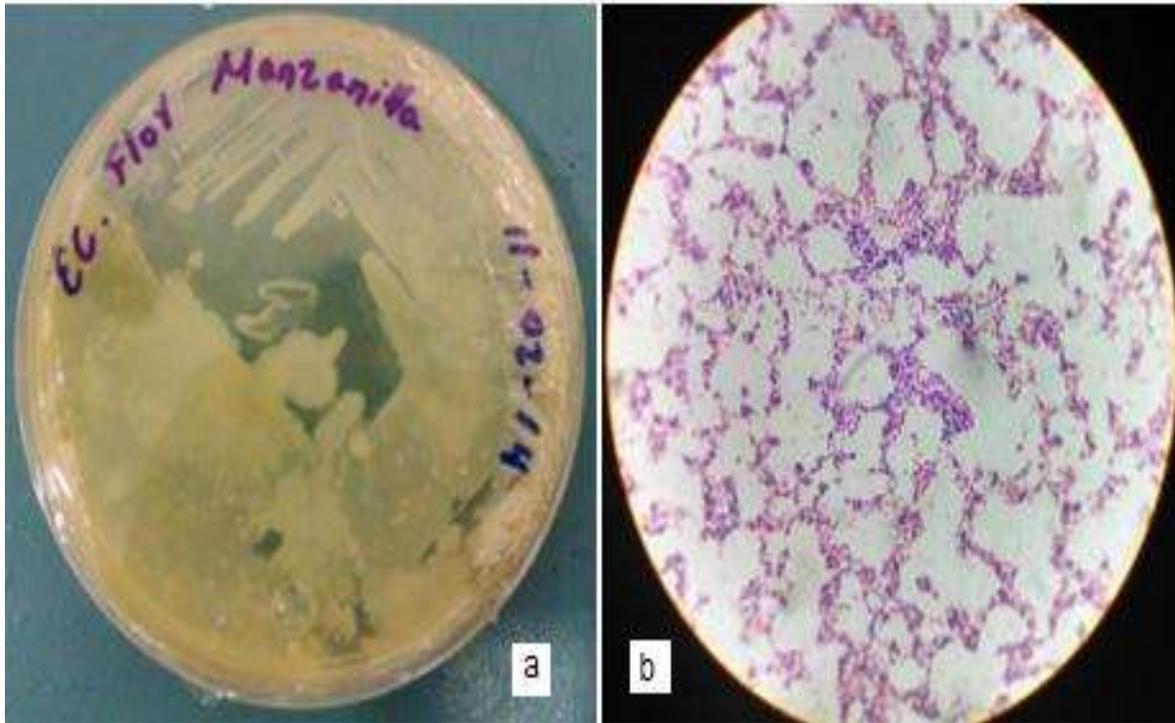


Figura 14. a) Sembrado masivo en agar Mueller Hinton de EC de flor de Manzanilla (macerado flor fresca). b) Tinción de Gram de sembrado masivo de EC de flor de Manzanilla (magnificación 100x).

En el caso del sembrado masivo del té Natural de hoja de Manzanilla (infusión) se puede apreciar un crecimiento bacteriano del 25%. Y en la tinción de Gram observado de este sembrado se encontraron cocobacilos Gram negativos. Como se muestra en la (figura 15).

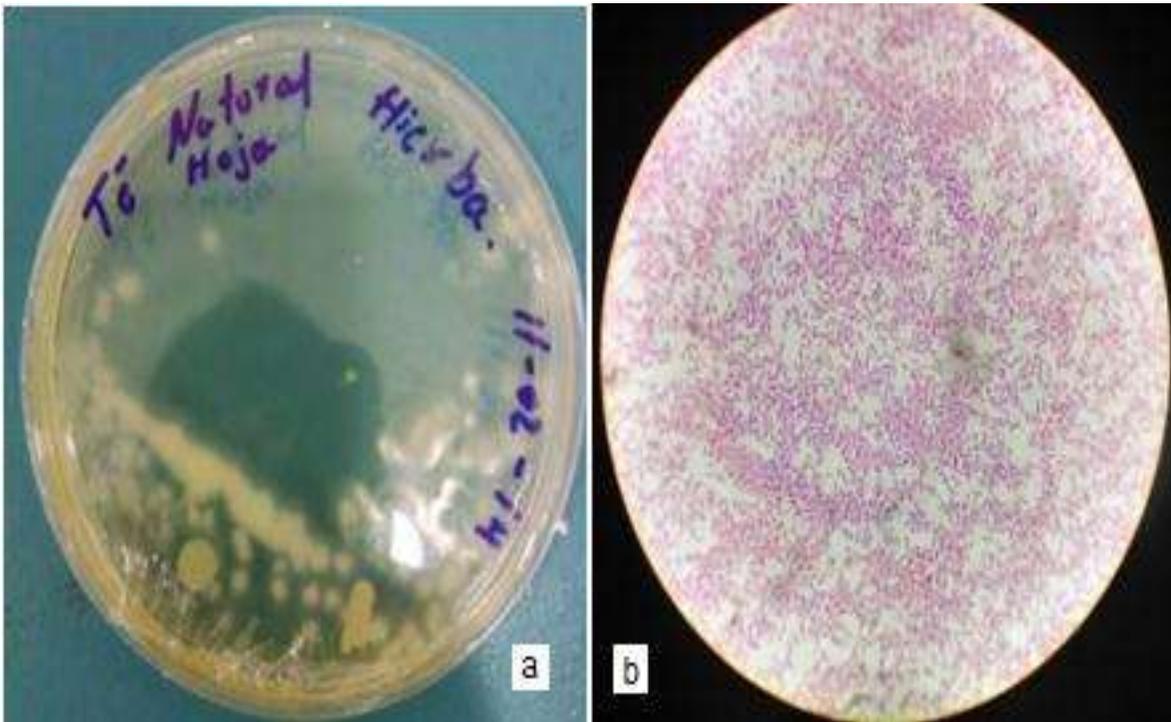


Figura 15. a) Sembrado masivo en agar Mueller Hinton de té Natural de Hoja de Manzanilla (infusión). b) Tinción de Gram de sembrado masivo De Té Natural de Hoja de Manzanilla (magnificación 100x).

En el sembrado masivo del té Natural de Flor de Manzanilla (infusión), el crecimiento obtenido es de 30%, y en cuanto a la Tinción de Gram se encontraron cocos Gram positivos. Como se muestra en la (figura 16).

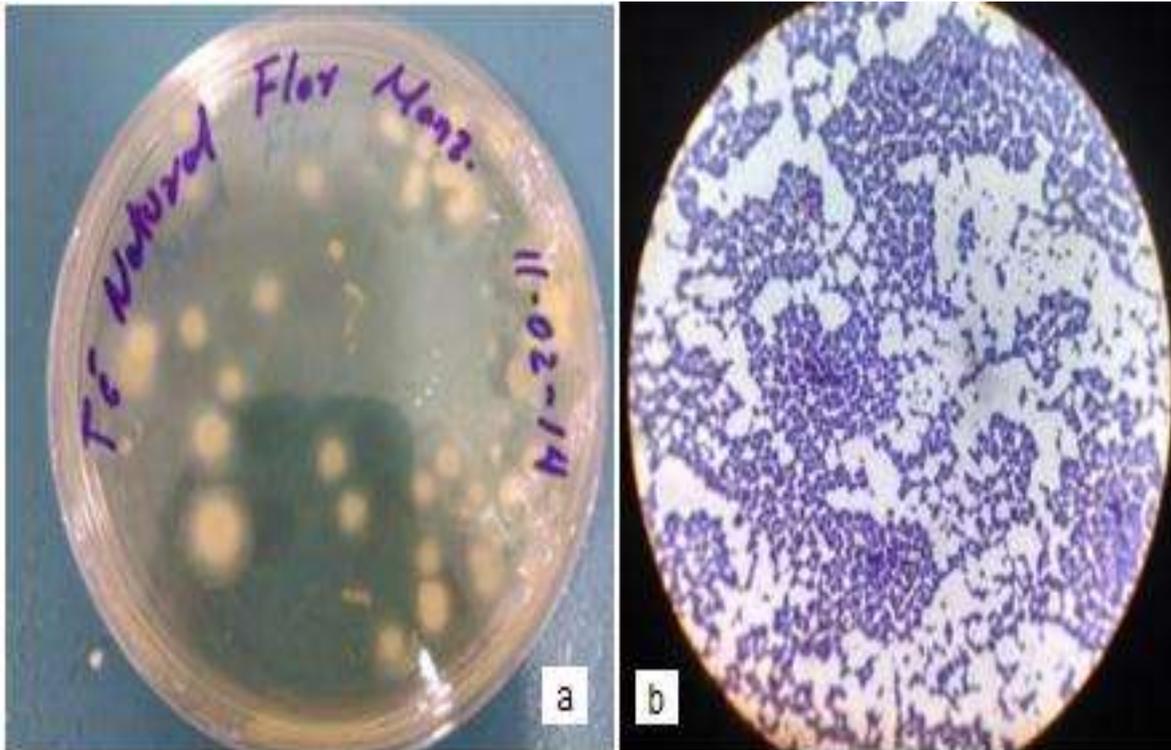


Figura 16. a) Sembrado masivo en agar Mueller Hinton de té Natural de Flor de Manzanilla (infusión). b) Tinción de Gram de sembrado masivo De Té Natural de Flor de Manzanilla (magnificación 100x).

Por último también se realizó sembrado masivo de un té comercial de Manzanilla (bolsa), en el cual sí hubo un poco de crecimiento bacteriano en el agar Mueller Hinton, con un porcentaje del 5% y en el frotis de la tinción de Gram se observaron cocos Gram positivos. Como se muestra en la (figura 17).

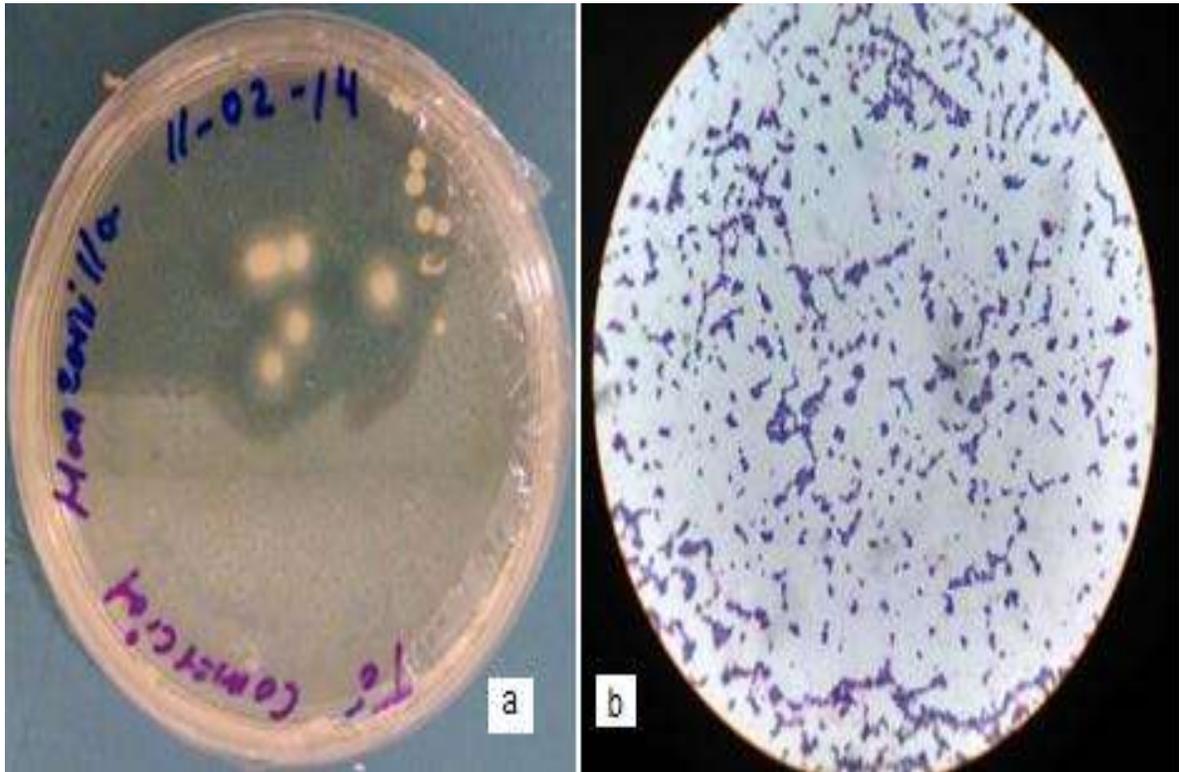


Figura 17 a) Sembrado masivo en agar Mueller Hinton de té comercial de Manzanilla (bolsa). b) Tinción de Gram de sembrado masivo de Té comercial de manzanilla (bolsa) (magnificación 100x).

En la tabla 12 se resume el grado de contaminación bacteriana de los extractos acuosos, tés naturales de hoja y flor así como de un té comercial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). También se describe el tipo de microorganismo que corresponde a este crecimiento bacteriano, esto con la ayuda de una Tinción de Gram.

Tabla 12 .Sembrados masivos de extractos acuosos, tés naturales de hoja y flor, y de Té comercial (bolsa), de MANZANILLA (Matricaria chamomilla).

Muestra	Tinción de Gram	Porcentaje de crecimiento en la placa
Extracto crudo (acuoso) de hoja de Manzanilla.	Cocobacilos Gram + y Gram -	65 %
Extracto crudo de flor de Manzanilla (macerado flor fresca).	Cocos Gram + Y Cocobacilos Gram	90 %
Infusión (Te natural) hoja de Manzanilla	Bacilos Gram -	25 %
Té Natural Flor de Manzanilla	Cocos Gram +	30 %
Té comercial de Manzanilla	Cocos Gram +	5 %

Infusión o Té Natural: Preparado a partir de hojas (2g) o flores (2g) frescas a punto de partir ebullición el agua (100mL). **Te comercial (Sobres comerciales de té)** con 100°C el agua.

8.3 Evaluación de la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos de flores y hojas de manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto crudo, fracción sin pigmentos, pigmentos alcohólicos y pigmentos acetónicos de flor y hoja de manzanilla, contra las siguientes cepas patógenas Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, y Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 27543, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) s/n, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Shigella sonnei* s/n, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

8.3.1 Evaluación de la capacidad antibacteriana de extracto crudo de Hojas (ECHM) y Flores de Manzanilla (ECFM) contra cepas ATCC.

Se comenzó por evaluar la actividad antibacteriana de los extractos crudos contra cada una de las cepas patógenas ya mencionadas, para esto se realizaron antibiogramas siguiendo el método de Kirby Bauer, los resultados obtenidos fueron que la única bacteria con sensibilidad al extracto crudo de flor fue *Escherichia coli* ATCC 25922, en la tabla 13 se muestra el CIM obtenido y en la figura 18 los halos de inhibición que presentó a diferentes diluciones, así como del halo de inhibición del antibiótico al cual es sensible esta bacteria.

Tabla 13. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto crudo de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Extracto crudo de flor de Manzanilla 0.882 mg/ml	1:1	8 mm	
	1:2	9 mm	
	1:4	9 mm	
	1:8	11 mm	0.110 mg/ml
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	5 mm	0.31mg/ml



Figura 18 Actividad antibacteriana de extracto crudo de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para el caso del extracto crudo de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), también la única bacteria que presentó sensibilidad fue la *Escherichia coli* ATCC 25922. En la tabla 14 se muestra la CIM de 0.169 mg/ml, y en la figura 19 los halos de inhibición obtenidos.

Tabla 14. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extracto crudo de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Extracto crudo de Hoja de Manzanilla 0.678 mg/ml	1:1	9 mm	
	1:2	9 mm	
	1:4	10 mm	0.169 mg/ml
	1:8	-	
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	5 mm	0.312 mg/ml



Figura 19 Actividad antibacteriana de extracto crudo de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

En la tabla 15 se hace una comparación de las CIM de los extractos crudos tanto de hojas como de flores contra la *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 15. CIM de los extractos crudos acuosos de hoja y flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) (ECFM, ECHM), contra *E. coli* ATCC 25922.

Bacteria	Muestra	CIM
<i>E. coli</i> ATCC 25922.	ECFM	0.110 mg/ml
	ECHM	0.08 mg/ml

ECFM= Extracto crudo de flores de Manzanilla; **ECHM**= Extracto crudo de hojas de Manzanilla; **CIM**= Concentración inhibitoria mínima.

8.3.2 Evaluación de la capacidad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja y Flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra diferentes cepas ATCC.

Para esta evaluación también se realizaron antibiogramas con el método de Kirby Bauer, para preparar la muestra y las diluciones se partió de 4 mg de pigmento por ml de DMSO. Una de las bacterias que mostró sensibilidad a pigmentos acetónicos de flor fue *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. En la cual se puede ver en la tabla 16 el CIM para esta bacteria es de 2 mg/ml en la dilución 1:2 y en la figura 20 el tamaño de halos de inhibición incluyendo el del antibiótico.

Tabla 16. Concentración inhibitoria mínima (CIM) pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	9 mm	
	1:2	8 mm	2 mg/ml
	1:4	6 mm	
	1:8	6 mm	
Penicilina 500 mg/2ml (Control positivo)	1:256	14 mm	1.95 mg/ml



Figura 20. Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

Otra bacteria sensible a los pigmentos acetónicos de flor es el *Bacillus cereus* ATCC 14579, en la tabla 17 se muestra que la CIM es de 2mg/ml en la dilución 1:2, y en la figura 21 se muestran los diferentes halos de inhibición.

Tabla 17. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14579

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	12 mm	
	1:2	9 mm	2 mg/ml
	1:4	6 mm	
	1:8	6 mm	
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	15 mm	0.31 mg/ml

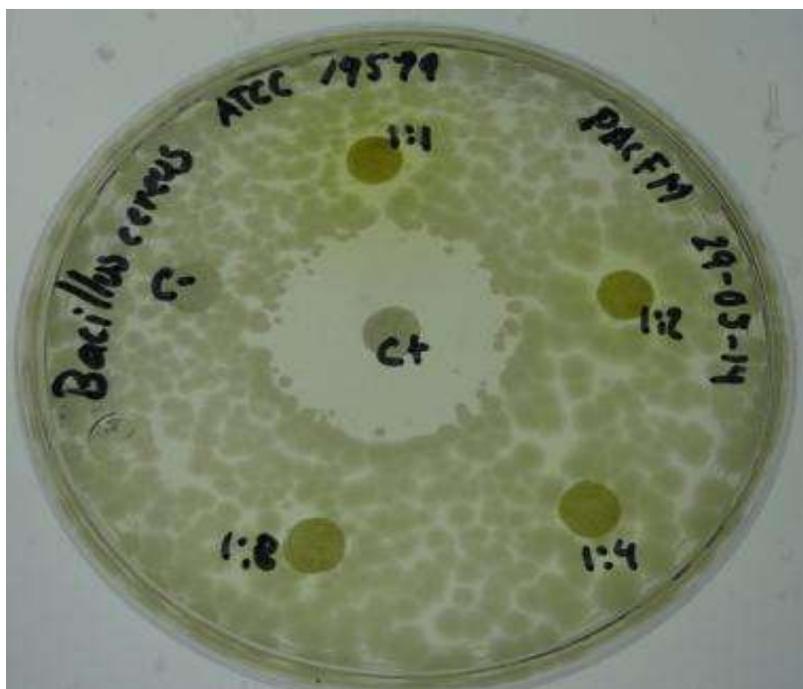


Figura 21. Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14579.

La tercer bacteria sensible a los pigmentos acetónicos de la flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) es la *Shigella sonnei* s/n, en la tabla 18 se encuentra la CIM que es de 0.5 mg/ml en la dilución 1:8 y la figura 22 muestra los halos de inhibición en las diferentes diluciones.

Tabla 18 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Shigella sonnei* s/n

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	9 mm	
	1:2	8 mm	
	1:4	8 mm	
	1:8	7 mm	0.5 mg/ml
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	12 mm	0.31 mg/ml

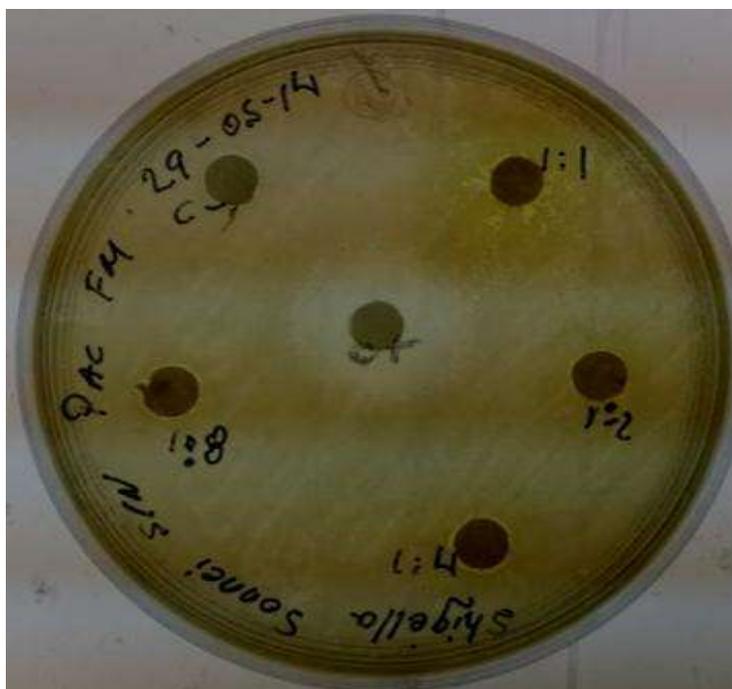


Figura 22. Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Shigella sonnei* s/n.

La misma evaluación se realizó pero utilizando pigmentos acetónicos de hoja contra las mismas cepas, los resultados son los siguientes: Para el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, se obtuvo una CIM de 2mg/ml de pigmentos acetónicos (tabla 19), y presentó halos de inhibición en la dilución 1:1 y 1:4 (figura 23).

Tabla 19 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	8 mm	
	1:2	7 mm	2 mg/ml
	1:4	-	
	1:8	-	
Penicilina 500 mg/2ml (Control positivo)	1:256	11 mm	1.95 mg/ml

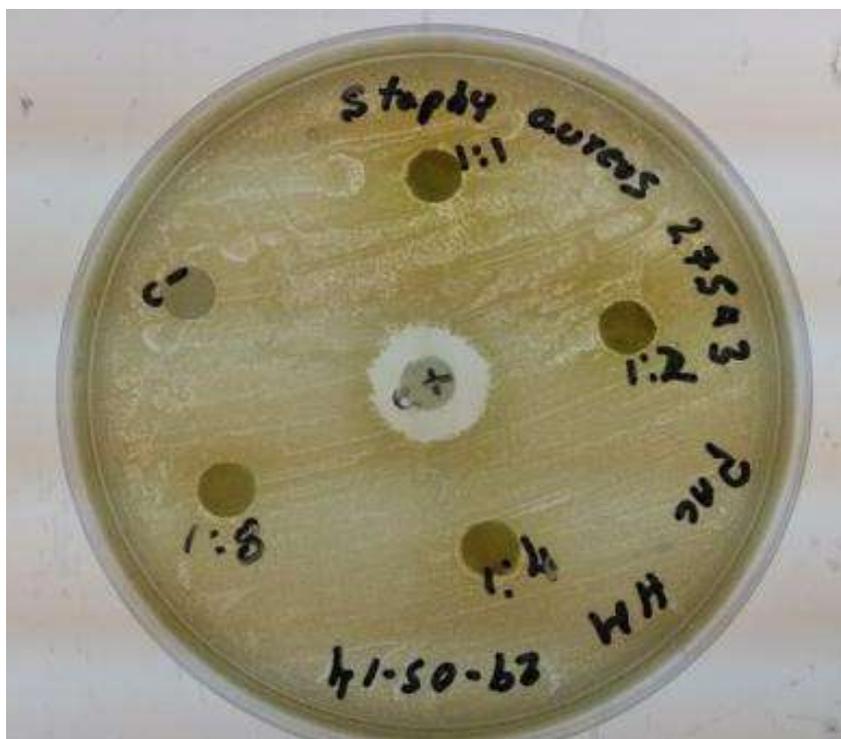


Figura 23 . Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

Contra el *Bacillus cereus* ATCC 14579, se obtuvo una CIM de 4mg/ml en la dilución 1:1 (tabla 20), y con halo de inhibición en la misma dilución (figura 24).

Tabla 20. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	8 mm	4 mg/ml
	1:2	0 mm	
	1:4	0 mm	
	1:8	-	
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	12 mm	0.31mg/ml



Figura 24 . Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14579.

CIM para *Shigella sonnei* s/n fue de 0.5 mg/ml (tabla 21), y se observaron halos de Inhibición en las diluciones 1:4 hasta 1:8 (figura 25).

Tabla 21 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Shigella sonnei* s/n

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	0 mm	
	1:2	0 mm	
	1:4	7 mm	
	1:8	7 mm	0.5mg/ml
Gentamicina 80 mg/2ml (Control positivo)	1:256	13 mm	0.31 mg/ml

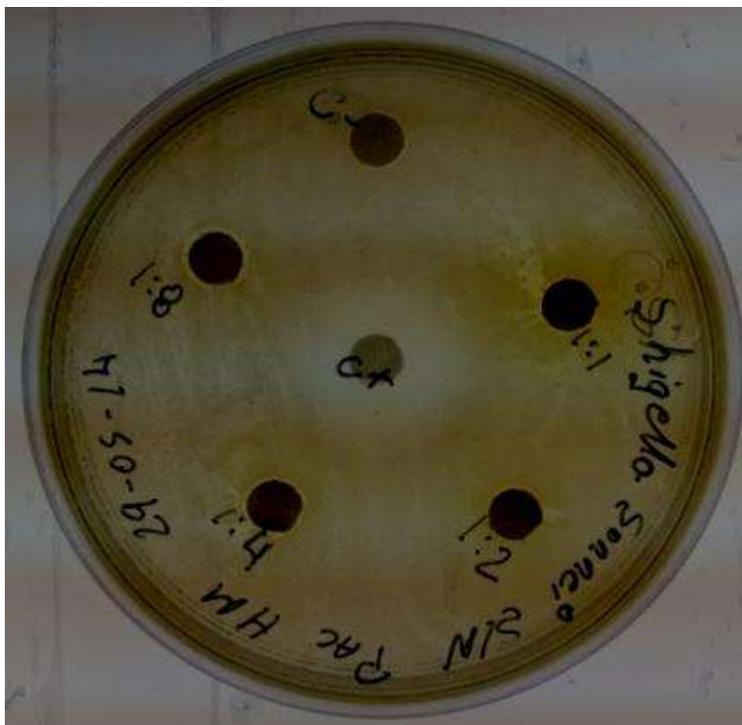


Figura 25 Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Shigella sonnei* s/n.

En la tabla 22 se resume las CIM de los pigmentos acetónicos contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Shigella sonnei* s/n. que fueron las únicas que presentaron sensibilidad a estos pigmentos acetónicos

Tabla 22. CIM de pigmentos acetónicos de hoja y flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), contra diferentes cepas ATCC.

BACTERIA	MUESTRA	CIM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	PACFM	2 mg/ml
	PACHM	2 mg/ml
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	PACFM	2 mg/ml
	PACHM	4 mg/ml
<i>Shigella sonnei</i> s/n	PACFM	0.5 mg/ml
	PACHM	0.5 mg/ml

PACFM: Pigmentos acetónicos de flores de Manzanilla; PACHM: Pigmentos acetónicos de hojas de Manzanilla.

8.3.3 Evaluación antibacteriana de los pigmentos alcohólicos de flor y hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra cepas ATCC.

Para esta evaluación también se siguió el método de Kirby Bauer, se utilizó una concentración de 4mg/ml de pigmentos acohólicos tanto de flor como de hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)(PALFM,PALHM), contra las diferentes cepas ATCC.

Las únicas cepas que mostraron sensibilidad contra los pigmentos alcohólicos de flor fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Shigella sonnei* s/n, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

La CIM necesaria para el efecto antibacteriano de pigmentos de flor contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, es de 2 mg/ml en la dilución 1:2 (tabla 23), y se observaron halos de inhibición en la dilución 1:1 y 1:2 (figura 26).

Tabla 23 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	8 mm	
	1:2	7 mm	2 mg/ml
	1:4	-	
	1:8	-	
Penicilina 500mg/2ml (Control positivo)	1:256	12 mm	1.95mg/ml



Figura 26. Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543.

CIM para el efecto antibacteriano de estos pigmentos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 2 mg/ml en la dilución 1:2 (tabla 24), y presentaron halos de inhibición en las diluciones 1:1 y 1:2 (figura 27).

Tabla 24 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	8 mm	
	1:2	7 mm	2mg/ml
	1:4	-	
	1:8	-	
Penicilina 500mg/2ml (Control positivo)	1:256	12 mm	1.95 mg/ml

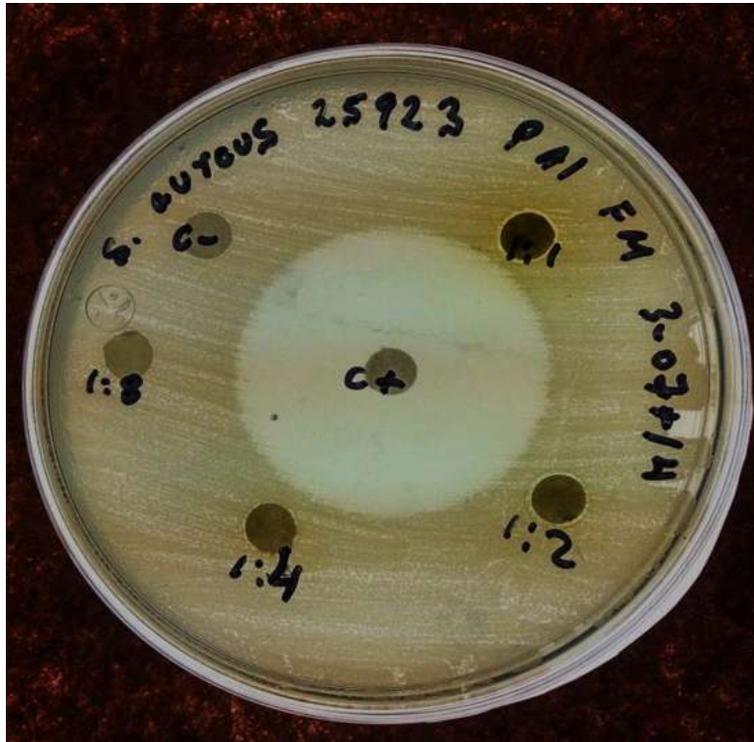


Figura 27. Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

El resultado de la CIM necesaria para el efecto antibacteriano contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 es de 4 mg/ml (tabla 25), presentando halos de inhibición en la dilución 1:1 (figura 28).

Tabla 25 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	11 mm	4 mg/ml
	1:2	-	
	1:4	-	
	1:8	-	
Gentamicina 80 mg/2ml (Control positivo)	1:256	15 mm	0.31mg/ml



Figura 28 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14579.

CIM para *Shigella sonnei* s/n, es de 4 mg/ml y se encontró en la dilución 1:2 (tabla 26), los halos de inhibición se observan en la dilución 1:1 (figura 29)

Tabla 26 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Shigella sonnei* s/n.

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	8 mm	4 mg/ml
	1:2	-	
	1:4	-	
	1:8	-	
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	12 mm	0.31mg/ml

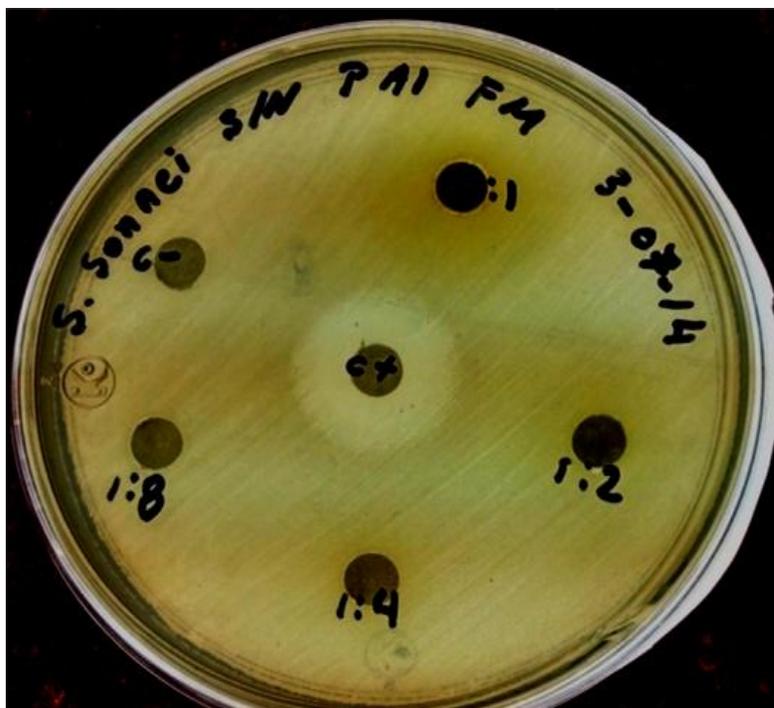


Figura 29 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Shigella sonnei* s/n.

Para la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 la CIM necesaria es de 4 mg/ml se encontró en la dilución 1:1 (tabla 27), y esta dilución fue la única que presentó halo de inhibición (figura 30).

Tabla 27 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	9 mm	4 mg/ml
	1:2	-	
	1:4	-	
	1:8	-	
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:128	10 mm	0.62 mg/ml

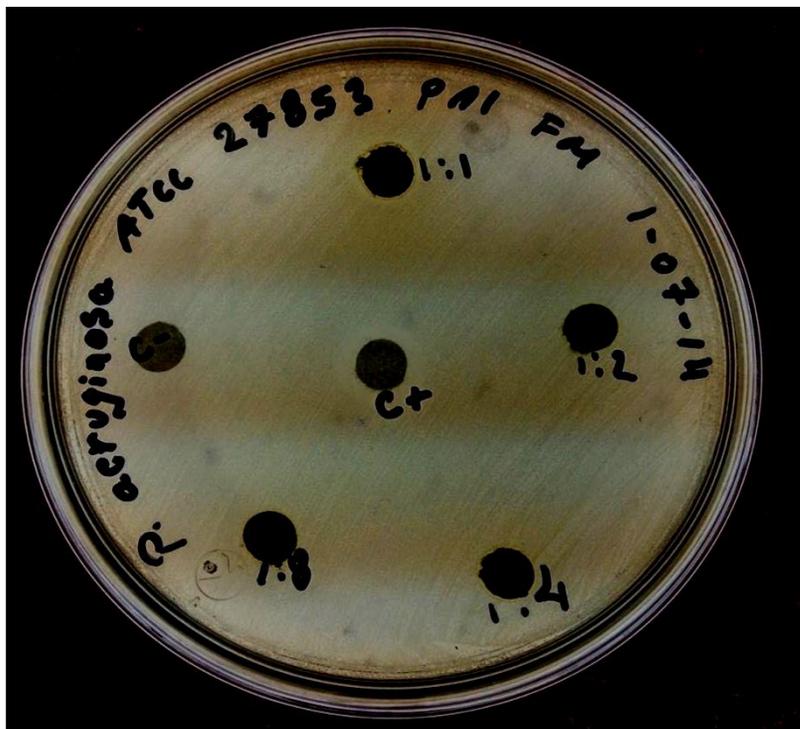


Figura 30 Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la prueba contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 la CIM necesaria es de 0.5 mg/ml en la dilución 1:8 (tabla 28), y se observaron halos de inhibición desde la dilución 1:1 hasta la dilución 1:8 (figura 31).

Tabla 28 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	13 mm	
	1:2	10 mm	
	1:4	9 mm	
	1:8	8 mm	0.5mg/ml
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	16 mm	0.31mg/ml



Figura 31. Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Los pigmentos alcohólicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) ante las diferentes cepas ATCC, la única que mostró sensibilidad es la *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, la cual necesita una CIM de 4 mg/ml en la dilución 1:1 (tabla 29), se observa el halo en dilución 1:1 (figura 32).

Tabla 29 CIM de pigmentos alcohólicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Pigmentos alcohólicos de Hoja de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) 4mg/ ml	1:1	8 mm	4 mg/ml
	1:2	-	
	1:4	-	
	1:8	-	
Gentamicina 80mg/2ml (Control positivo)	1:256	14 mm	0.31mg/ml



Figura 32 . Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos de Hoja de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

En la tabla 30 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) necesarias, de los pigmentos alcohólicos de flor (se indica con color naranja) y pigmentos de hoja (se indica con color verde), contra las diferentes cepas ATCC que presentaron sensibilidad a estos pigmentos.

Tabla 30 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de pigmentos alcohólicos de hoja y flor de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), contra diferentes cepas ATCC.

BACTERIA	MUESTRA	CIM
<i>S. aureus</i> ATCC 27543	PALFM	2 mg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	PALFM	2 mg/ml
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	PALFM	4 mg/ml
<i>Shigella sonnei</i> s/n	PALFM	4 mg/ml
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	PALFM	4 mg/ml
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	PALFM	0.5 mg/ml
	PALHM	4 mg/ml

PALFM: Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla; **PALHM:** Pigmentos alcohólicos de hojas de Manzanilla.

8.4 Evaluación del efecto bacteriostático o bactericida de los extractos de flores y hojas de manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

En esta evaluación se utilizó el Método de Courvalin *et al* (2006), se utilizaron las diluciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8, de las muestras, un control positivo y dos negativos. Para el análisis estadístico con ayuda del programa prisma se realizó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc de tukey, esto para comparar las medidas de las absorbancias a los diferentes tiempos. Si en la concentración mínima que presenta efecto, los valores obtenidos de absorbancia no tienen diferencia significativa entre sí (NS), ésta es considerada como concentración bacteriostática mínima (CBaM), y si tienen diferencia significativa, es considerada como concentración bactericida mínima (CBM). También se realizó esta prueba para hacer una comparación entre las concentraciones de las muestras y los controles.

8.4.1 Evaluación del efecto bacteriostático o bactericida de extractos crudos de flores y hojas de Manzanilla.

El ECFM en la prueba de difusión en placa, sí tuvo efecto contra la *E. coli* ATCC 25922, pero en esta prueba se observó que no hay disminución de la absorbancia (Tabla 3). En el análisis entre las concentraciones y controles, las concentraciones 0.882 y 0.441mg/ml tienen diferencias significativas con el resto de las concentraciones y controles (* P< 0.05).

Tabla 31 Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución y tiempo, de ECFM contra *E. coli* ATCC 25922.

Bacteria	ECFM (mg/ml)	0min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>E. coli</i> ATCC 25922	C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+	0.009	0.009	0.010	0.080	0.225	0.278	0.330	0.779	0.871
	CE	0.480	0.468	0.479	0.473	0.465	0.472	0.469	0.457	0.470
	0.882 *	0.664	0.700	0.594	0.846	0.915	1.008	1.126	1.068	1.087
	0.441 *	0.447	0.452	0.469	0.592	0.707	0.765	0.906	0.852	1.250
	0.22	0.257	0.307	0.382	0.441	0.595	0.621	0.817	0.878	1.120
	0.110	0.204	0.258	0.122	0.390	0.491	0.570	0.779	0.861	0.871

ECFM= Extracto crudo de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. * = (* P< 0.05).

El ECFM también tuvo efecto contra *E. coli* ATCC 25922 una CBaM de 0.678 mg/ml (color verde) ya que la absorbancia no tuvo cambio significativo durante las 24 horas de incubación (tabla 32), en el análisis estadístico la concentración 0.678 y 0.339mg/ml presentaron diferencia significativa con las demás concentraciones y con los controles (* P< 0.05).

Tabla 32. Análisis de variación de absorbancia (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de ECHM contra *E. coli* ATCC 25922.

Bacteria	ECHM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>E. coli</i> ATCC 25922	C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+	0.005	0.010	0.015	0.139	0.274	0.283	0.281	0.359	0.840
	CE	1.217	1.209	1.226	1.213	1.219	1.198	1.227	1.225	1.250
	0.678 *	1.231	1.293	1.120	1.413	1.488	1.394	1.309	1.305	1.240
	0.339*	0.648	0.654	0.672	0.813	0.910	0.957	1.092	1.120	1.397
	0.169	0.384	0.409	0.328	0.560	0.642	0.722	0.920	0.980	1.350
	0.084	0.257	0.288	0.205	0.450	0.558	0.633	0.822	0.769	1.522

ECHM= Extracto crudo de hoja de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+=** Control positivo, **C-**= negativo. * = (* P < 0.05).

En la tabla 33 se puede observar el tiempo mínimo de inhibición, el tipo de efecto y a que concentración tienen los extractos crudos de las hojas y flores de la Manzanilla sobre las cepas que presentaron sensibilidad a estos.

Tabla 33. CBM y CBaM de los extractos crudos de hojas y flores de la Manzanilla contra diferentes cepas ATCC.

BACTERIA	MUESTRA	TIM	CBM	CBaM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	ECFM 0.882mg/ml	-----	-----	-----
	ECHM 0.678mg/ml	24h en 0.678mg/ml	-----	0.678 mg/ml

ECFM y **ECHM**= extracto crudo de flor y hoja de Manzanilla, **CBM**= concentración bactericida mínima, **CBaM**= Concentración bacteriostática. **TIM**=Tiempo mínimo de inhibición. ----- = Sin efecto

8.4.2 Evaluación del efecto bacteriostático o bactericida de pigmentos acetónicos de flores y hojas de Manzanilla.

Los pigmentos acetónicos de flor de manzanilla contra *S. aureus* ATCC 27543 presentaron una disminución de absorbancia en la concentración 4mg/ml, aunque desde el tiempo cero hasta las 24h, siendo una CBM de 4mg/ml (color naranja), en el análisis de la concentración el control de pigmento no tuvo diferencia significativa, las concentraciones tuvieron diferencias leves entre sí y con los controles positivo y negativo si tienen diferencia significativa (* P< 0.05) con las concentraciones.

Tabla 34 . Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACFM contra *S. aureus* ATCC 27543.

Bacteria	PACFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>S. aureus</i> ATCC 27543	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.08	0.08	0.010	0.014	0.020	0.031	0.090	0.182	0.385
	CE	1.180	1.194	1.200	1.198	1.189	1.201	1.213	1.199	1.197
	4	1.402	1.406	1.422	1.343	1.256	1.166	1.078	0.955	0.810
	2	1.343	1.339	1.352	1.265	1.287	1.292	1.265	1.252	1.244
	1	1.150	1.159	1.163	1.175	1.234	1.287	1.345	1.380	1.512
	0.5	1.095	1.092	1.115	1.130	1.203	1.502	1.250	1.175	1.280

PACFM= Pigmentos acetónicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. * = (* P< 0.05).

Los pigmentos acetónicos de hoja tuvieron efecto contra *S. aureus* ATCC 27543, en la concentración 2 y 4mg/ml se observó que la absorbancia se mantuvo constante desde el tiempo cero hasta las 24h, por esto es efecto bacteriostático con una CBaM de 2mg/ml (color verde), en el análisis estadístico los tres controles tienen diferencia significativa (* P< 0.05) con las concentraciones (tabla 35).

Tabla 35. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACHM contra *S. aureus* ATCC 27543.

Bacteria	PACHM mg/ml	0min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
S. aureus ATCC 27543	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.05	0.05	0.012	0.016	0.030	0.042	0.085	0.135	0.776
	CE *	1.385	1.384	1.391	1.378	1.394	1.388	1.390	1.385	1.393
	4	1.534	1.575	1.590	1.734	1.726	1.735	1.767	1.753	1.638
	2	1.512	1.569	1.578	1.635	1.623	1.621	1.632	1.620	1.523
	1	1.465	1.472	1.483	1.503	1.634	1.864	1.897	1.902	1.830
	0.5	1.399	1.403	1.407	1.515	1.623	1.792	1.858	1.879	1.700

PACHM= Pigmentos acetónicos de hojas de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo, * = (* P< 0.05)

Los pigmentos de flor contra la Cepa *B. cereus* ATCC 14579, en las concentraciones 2 y 4 mg/ml se observa una disminución de absorbancia durante las 24 h, en la concentración 1mg/ml se mantiene constante, tal efecto es bacteriostático pues no hay significancia en tal disminución la CBaM es de 1mg/ml (color naranja), en el análisis estadístico de las concentraciones los controles positivo y negativos tienen diferencia significativa (*P<0.05) con las concentraciones (tabla 36).

Tabla 36. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACFM contra *B. cereus* ATCC 14579.

Bacteria	PACFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.013	0.015	0.019	0.021	0.027	0.040	0.088	0.232	0.490
	CE *	1.185	1.184	1.191	1.178	1.194	1.188	1.190	1.185	1.193
	4	1.445	1.448	1.459	1.415	1.350	1.276	1.145	1.056	1.010
	2	1.367	1.376	1.383	1.307	1.256	1.278	1.227	1.187	1.090
	1	1.202	1.216	1.228	1.206	1.165	1.187	1.153	1.139	1.158
	0.5	1.189	1.197	1.201	1.243	1.479	1.568	1.702	1.636	1.787

PACFM= Pigmentos acetónicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo * = (* P< 0.05)

Los pigmentos acetónicos de hojas contra esta cepa, en las concentraciones 2 y 4mg/ml mostraron una disminución sin significancia de la absorbancia, tal efecto es bacteriostático con una CBaM de 2 mg/ml (color verde), en el análisis estadístico se comprueba una diferencia significativa (* P< 0.05) entre los controles y las diferentes concentraciones (tabla 37).

Tabla 37. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACHM contra *B. cereus* ATCC 14579.

Bacteria	PACHM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.008	0.008	0.010	0.014	0.020	0.031	0.090	0.182	0.385
	CE *	1.402	1.398	1.396	1.376	1.412	1.399	1.408	1.397	1.402
	4	1.719	1.723	1.739	1.753	1.790	1.823	1.876	1.693	1.508
	2	1.658	1.672	1.688	1.697	1.638	1.603	1.634	1.609	1.567
	1	1.523	1.534	1.559	1.576	1.643	1.687	1.592	1.572	1.683
	0.5	1.415	1.421	1.437	1.465	1.474	1.573	1.612	1.623	1.798

PACHM= Pigmentos acetónicos de hojas de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. * = (*P< 0.05)

Para el caso de la *Shigella sonnei* s/n los pigmentos acetónicos de flor presentaron una pequeña disminución de la absorbancia en las concentraciones 2 y 4 mg/ml, pero sin diferencia significativa, considerando a 2 mg/ml como la CBaM (color naranja), en cuanto al análisis estadístico los controles muestran diferencia significativa (* P< 0.05) con las cuatro concentraciones de la muestra (tabla 39).

Tabla 38. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACFM contra *Shigella sonnei*.

Bacteria	PACFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Shigella s/n	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.019	0.019	0.022	0.032	0.088	0.205	0.340	0.620	1.102
	CE *	1.189	1.196	1.186	1.176	1.192	1.191	1.201	1.268	1.193
	4	1.698	1.699	1.708	1.696	1.622	1.550	1.512	1.434	1.445
	2	1.514	1.518	1.520	1.424	1.434	1.408	1.410	1.407	1.402
	1	1.378	1.383	1.388	1.391	1.399	1.432	1.498	1.608	1.723
	0.5	1.207	1.209	1.214	1.219	1.229	1.317	1.499	1.612	1.765

PACFM= Pigmentos acetónicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**=Control positivo, **C-**= negativo. *= (*P< 0.05)

Los pigmentos acetónicos de hoja contra la *Shigella sonnei* s/n en las concentraciones 2 y 4 mg/ml no tuvieron aumento ni disminución significativa (tabla 39), considerando tal efecto bacteriostático con una CBaM de 2 mg/ml (color verde), los controles en el análisis estadístico tienen una diferencia significativa (*P< 0.05) con las diferentes concentraciones de los pigmentos.

Tabla 39. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PACHM contra *Shigella sonnei*.

Bacteria	PACHM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Shigella s/n	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.011	0.011	0.022	0.028	0.078	0.195	0.290	0.720	1.132
	CE *	1.398	1.396	1.386	1.376	1.392	1.391	1.401	1.389	1.393
	4	1.625	1.625	1.632	1.667	1.632	1.623	1.622	1.578	1.566
	2	1.539	1.541	1.545	1.601	1.654	1.712	1.734	1.632	1.602
	1	1.435	1.436	1.439	1.446	1.645	1.654	1.712	1.645	1.654
	0.5	1.423	1.425	1.428	1.437	1.478	1.501	1.578	1.546	1.655

PACHM= Pigmentos acetónicos de hojas de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo.* = (* P< 0.05)

En la tabla 40 se puede observar el tiempo de inhibición mínimo así como qué efecto y a qué concentración tienen los pigmentos acetónicos de las flores (color naranja) y hojas (color verde) de la Manzanilla sobre las cepas que presentaron sensibilidad a estos.

Tabla 40. CBM y CBaM de los pigmentos acetónicos de hoja y flor de la Manzanilla contra diferentes cepas ATCC.

BACTERIA	MUESTRA	TIM	CBM	CBaM
<i>S. aureus</i> ATCC 27543	PACFM 4 mg/ml	24h en 2 y 4mg/ml	-----	2mg/ml
	PACHM 4 mg/ml	24h en 2 y 4mg/ml	-----	2mg/ml
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	PACFM 4 mg/ml	24h en 1,2,4mg/ml	-----	1mg/ml
	PACHM 4 mg/ml	24h en 2 y 4mg/ml	-----	2mg/ml
<i>Shigella sonnei</i> s/n	PACFM 4 mg/ml	24h en 2 y 4mg/ml	-----	2 mg/ml
	PACHM 4 mg/ml	24h en 2 y 4mg/ml	-----	2mg/ml

PACFM=Pigmentos acetónicos de flores de Manzanilla, **PACHM**= Pigmentos acetónicos de hojas de Manzanilla, **TIM**= Tiempo de inhibición mínimo, **CBM**= Concentración bactericida mínima, **CBaM**= Concentración bacteriostática mínima. ----- = sin efecto

Los pigmentos alcohólicos de flor de Manzanilla también tuvieron efecto contra diferentes cepas de las que se utilizaron, contra el *S. aureus* ATCC 27543 presentaron una disminución no significativa en las concentraciones 2 y 4mg/ml durante las 24 horas de incubación por lo tanto es efecto bacteriostático con una CBaM de 2 mg/ml, en el análisis estadístico los controles mostraron una diferencia significativa (*P<0.05) con las concentraciones de la muestra (Tabla 41).

Tabla 41. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra *S. aureus* ATCC 27543

Bacteria	PALFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>S. aureus</i> ATCC 27543	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.013	0.013	0.015	0.022	0.076	0.123	0.324	0.800	1.200
	CE *	0.590	0.605	0.589	0.593	0.591	0.587	0.594	0.588	0.590
	4	0.724	0.723	0.733	0.745	0.708	0.762	0.668	0.616	0.518
	2	0.709	0.709	0.714	0.723	0.633	0.625	0.643	0.618	0.613
	1	0.678	0.677	0.682	0.689	0.719	0.789	0.834	0.897	1.167
	0.5	0.602	0.602	0.608	0.624	0.623	0.698	0.745	0.862	1.272

PALFM= Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. *= (*P< 0.05)

Contra *S. aureus* ATCC 25923 en la concentración 4 mg/ml no hubo disminución significativa de la absorbancia (color naranja) por lo tanto esta concentración es la CBaM, de acuerdo al análisis estadístico los controles tienen gran diferencia (*P<0.05) con las concentraciones de las muestras (Tabla 42).

Tabla 42. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra *S. aureus* ATCC 25923

Bacteria	PALFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+*	0.018	0.017	0.020	0.024	0.044	0.081	0.276	0.422	0.865
	CE*	0.588	0.588	0.593	0.587	0.590	0.591	0.585	0.593	0.589
	4	0.735	0.735	0.742	0.756	0.658	0.652	0.623	0.695	0.645
	2	0.687	0.685	0.692	0.701	0.713	0.785	0.799	0.832	0.997
	1	0.634	0.635	0.643	0.654	0.693	0.735	0.785	0.802	0.987
	0.5	0.597	0.597	0.603	0.623	0.698	0.760	0.802	0.867	1.061

PALFM= Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. * = (* P< 0.05)

Contra *B. Cereus* ATCC 14579 en 4 mg/ml hubo una disminución de absorbancia (color naranja) no significativa hasta las 24 h, esta concentración tiene efecto bacteriostático, en el análisis estadístico los tres controles mostraron diferencia significativa (*P<0.05) con las concentraciones de los pigmentos (Tabla 43).

Tabla 43. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra *B. cereus* ATCC 14579.

Bacteria	PALFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>B. Cereus</i> ATCC 14579	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.012	0.012	0.016	0.023	0.045	0.198	0.235	0.324	0.751
	CE *	0.589	0.589	0.594	0.597	0.593	0.593	0.588	0.589	0.592
	4	0.876	0.877	0.879	0.834	0.823	0.788	0.768	0.745	0.609
	2	0.783	0.782	0.795	0.812	0.834	0.898	0.965	1.023	1.248
	1	0.687	0.685	0.693	0.702	0.734	0.793	0.867	0.899	1.351
	0.5	0.602	0.603	0.608	0.613	0.645	0.697	0.756	0.805	1.469

PALFM= Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. * = (P< 0.05).

En el caso de la *S. sonnei* s/n la CBaM es de 4 mg/ml de estos pigmentos en la cual se observa una pequeña disminución de la absorbancia (color naranja) en las 24 horas pero no significativa, en el análisis de las concentraciones los controles tienen una diferencia significativa (*P<0.05) con las 4 diferentes concentraciones (tabla 44).

Tabla 44. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra *Shigella sonnei* s/n

Bacteria	PALFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>Shigella</i>	C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sonnei</i> s/n	C+	0.016	0.016	0.018	0.020	0.023	0.132	0.248	0.302	0.914
	CE	0.592	0.591	0.589	0.584	0.588	0.589	0.583	0.583	0.584
	4	0.945	0.944	0.955	0.978	0.866	0.854	0.812	0.823	0.662
	2	0.832	0.833	0.845	0.855	0.866	0.897	0.935	1.001	1.288
	1	0.723	0.720	0.723	0.725	0.739	0.823	0.934	1.200	1.540
	0.5	0.623	0.621	0.623	0.635	0.648	0.723	0.809	1.087	1.534

PALFM= Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo.* = (P< 0.05)

Estos pigmentos contra la *P. aeruginosa* ATCC 27853 tuvieron una CBaM DE 4 mg/ml ya que tuvo una disminución de absorbancia pero no significativa en las 24h (color naranja), los controles si tuvieron diferencia significativa (*P<0.05) con las diferentes concentraciones de los pigmentos (Tabla 45).

Tabla 45. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra *P. aeruginosa* ATCC 27853

Bacteria	PALFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.013	0.013	0.015	0.020	0.023	0.123	0.213	0.345	0.661
	CE *	0.601	0.599	0.601	0.597	0.597	0.602	0.598	0.599	0.586
	4	0.888	0.889	0.889	0.897	0.785	0.765	0.689	0.607	0.548
	2	0.723	0.724	0.734	0.756	0.789	0.845	0.899	0.967	1.005
	1	0.617	0.615	0.624	0.637	0.678	0.713	0.824	0.854	1.363
	0.5	0.523	0.524	0.527	0.534	0.567	0.614	0.723	0.790	1.432

PALFM= Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo, *= (*P< 0.05)

En la tabla 46 se muestran los resultados obtenidos de los PALFM contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, como se puede apreciar la concentración de 4mg/mL presentó un efecto bactericida. También se aprecia que conforme disminuyen las concentraciones utilizadas como en el caso de 1mg/ml presentó un efecto bacteriostático, con la concentración de 0.5 mg/ml fue muy pequeña por lo que ya no tiene efecto por lo que se aprecia un crecimiento bacteriano. Los controles mostraron una diferencia significativa (*P<0.05) con las concentraciones de los pigmentos.

Tabla 46. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALFM contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Bacteria	PALFM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.015	0.015	0.019	0.023	0.045	0.112	0.199	0.297	0.565
	CE *	0.599	0.597	0.599	0.603	0.595	0.601	0.597	0.595	0.598
	4 *	0.998	0.996	0.998	1.004	1.034	1.123	1.045	0.878	0.519
	2 *	0.867	0.865	0.872	0.879	0.913	0.965	0.917	0.876	0.553
	1	0.734	0.732	0.738	0.778	0.794	0.752	0.706	0.734	0.647
	0.5	0.603	0.605	0.625	0.645	0.675	0.698	0.767	0.989	1.156

PALFM= Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. *= (*P< 0.05)

En los resultados de los efectos de pigmentos alcohólicos de hoja de Manzanilla, la única bacteria que presentó sensibilidad fue la *L. monocytogenes* ATCC 7644, esto se puede apreciar con una concentración bactericida mínima de 4 mg/ml (color verde) ya que la disminución de absorbancia si tiene diferencia significativa desde el tiempo cero hasta las 24h de incubación, en el análisis estadístico los controles muestran diferencia significativa (* P< 0.05) con las concentraciones, en cambio la concentración 4mg/ml no tiene diferencia con las demás concentraciones pero estas otras si tienen una leve diferencia entre sí (tabla 47).

Tabla 47. Análisis de variación de absorbancias (625 nm) dependientes de dilución (concentración) y tiempo, de PALHM contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Bacteria	PALHM mg/ml	0 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
L. monocytogenes ATCC 7644	C- *	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C+ *	0.015	0.015	0.019	0.023	0.045	0.112	0.199	0.297	0.565
	CE *	0.699	0.704	0.698	0.698	0.701	0.702	0.698	0.704	0.697
	4	1.211	1.212	1.226	1.145	1.103	1.134	1.167	1.112	0.878
	2	0.923	0.922	0.935	0.989	1.023	1.112	1.225	1.324	1.440
	1	0.834	0.835	0.839	0.845	0.889	0.967	1.109	1.234	1.445
	0.5	0.768	0.767	0.782	0.795	0.846	0.895	0.957	1.123	1.423

PALHM= Pigmentos alcohólicos de hojas de Manzanilla, **CE**= Control negativo de extracto, **C+**= Control positivo, **C-**= negativo. * = (* P < 0.05)

En la tabla 48 se observa el tiempo mínimo de inhibición, que tipo de efecto y a que concentración tienen los pigmentos alcohólicos de las flores (color naranja) y hojas (color verde) de la Manzanilla sobre las cepas que presentaron sensibilidad a estos.

Tabla 48. CBM y CBaM de los pigmentos Alcohólicos de hojas y flores de la Manzanilla contra diferentes cepas ATCC.

BACTERIA	MUESTRA	TIM	CBM	CBaM
<i>S. aureus</i> ATCC 27543	PALFM	24h en 2 y 4mg/ml	-----	2mg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	PALFM	24h en 4mg/ml	-----	4mg/ml
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	PALFM	24h en 4mg/ml	-----	4mg/ml
<i>Shigella sonnei</i> s/n	PALFM	24h en 4mg/ml	-----	4mg/ml
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	PALFM	24h en 4mg/ml	-----	4mg/ml
L. monocytogenes ATCC 7644	PALFM	24h en 2 y 4mg/ml	4mg/ml	2mg/ml
	PALHM	24h en 4mg/ml	4 mg/ml	-----

PALFM=Pigmentos alcohólicos de flores de Manzanilla, **PALHM**= Pigmentos alcohólicos de hojas de Manzanilla, **TIM**= Tiempo de inhibición mínimo, **CBM**= Concentración bactericida mínima, **CBaM**= Concentración bacteriostática mínima. ---- = sin efecto.

IX DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación cumplieron con los objetivos planteados, para las pruebas de identificación de la morfología macroscópica y microscópica de las diez cepas ATCC se utilizaron medios de cultivo selectivos, estos tienen la función de crecer determinadas bacterias y además fácilmente identificar las morfologías coloniales macroscópicas, esto gracias a sus componentes, la tinción de Gram también fue de gran utilidad ya que nos permite comprobar microscópicamente si son microorganismos Gram positivos o Gram negativos, además de observar su forma y tamaño (cocos, bacilos, cocobacilos etc.). Ya que en esta técnica después de la fijación de la muestra en un portaobjetos de cristal, se expone a cristal violeta y después se agrega yodo para formar un complejo con el colorante principal. Durante la decoloración con alcohol o acetona, las Bacterias Gram positivas retienen el complejo (coloración azul), mientras que los microorganismos Gram negativos lo pierden; se añade Safranina como colorante de contraste, que es retenido por los microorganismos Gram negativos (coloración roja). (Murray, R., *et al*, 2006).

El Medio de cultivo MacConkey es utilizado para la recuperación de Enterobacterias y bacilos Gram negativos entéricos relacionados. Este medio contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el desarrollo de las bacterias Gram positivas, como fuente de carbono tiene la lactosa y como indicador el rojo neutro, por ello se observa la coloración rosada ya que la bacteria fermentan la lactosa como fuente nutritiva de carbono, este medio se utilizó para identificar a tres diferentes cepas de *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 27543 y *Escherichia coli enterotoxigénica* (ETEC) s/n. en las cuales se observaron colonias aisladas, medianas, circulares, convexas y sus bordes redondeados con una coloración rosada, de acuerdo a la bibliografía corresponden a Enterobacterias que fermentan Lactosa y con la Tinción de Gram se comprobó que son bacilos Gram negativos (coloración roja) (figura 3, 4 y 5).

Agar Sal y Manitol medio selectivo para las *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, es un medio de alta concentración de cloruro sódico (75 g/l) la mayoría de los microorganismos no crece a esta concentración de sal, mientras que estas bacterias si crecen teniendo como fuente de carbono el manitol y como indicador al rojo fenol, por lo que permite aprovechar la patogenia y la capacidad fermentadora de manitol de los *Staphylococcus*, por lo tanto se observan colonias bien definidas lisas, convexas y color amarillas ya que fermentan el manitol siendo indicativo de que son bacterias patógenas. Microscópicamente se observaron cocos Gram positivos acomodados en forma de racimos de uva (característico de los *Staphylococcus*) (figura 4 y 5).

Agar Sangre se prepara añadiendo un 5 % de sangre (oveja, caballo, conejo) a una base rica en agar, permitiendo el crecimiento de todos los microorganismos con importancia clínica excepto el de las más exigentes además de permitir observar la capacidad hemolítica de las bacterias patógenas, esto es ciertas bacterias producen enzimas extracelulares que actúan sobre los glóbulos rojos. Observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias se determina el tipo de hemólisis que poseen: hemólisis α , es una hemólisis incompleta, caracterizada por la destrucción parcial de la membrana de los eritrocitos a simple vista ésta se detecta por la aparición de una coloración verdosa alrededor de la colonia. La hemólisis beta se caracteriza por la destrucción total de la membrana y se detecta por la aparición de un halo transparente alrededor de la colonia. Cuando los microorganismos no producen ningún tipo de hemólisis se dice que son γ hemolíticos. Este medio se utilizó para identificar a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Las colonias de la primera se mostraron redondeadas pequeñas, convexas y lisas, con una coloración blanquecina opaca y la formación de un halo transparente lo que nos indica una bacteria β hemolítica, su morfología microscópica fue de bacilos Gram negativos (figura 6). En la morfología de *Bacillus cereus* ATCC 14579 hubo presencia de colonias grandes e irregulares de color verdoso con un centro brillante y un halo transparente lo que nos indica una β -hemólisis o hemólisis total, microscópicamente se observaron bacilos Gram positivos, largos y algunos agrupados en forma de pequeñas cadenas (figura 7). La

Listeria monocytogenes ATCC 7644 creció en forma de colonias pequeñas redondas convexas de una coloración grisácea con un halo transparente indicativo de un β hemólisis, y en la Tinción de Gram como bacilos pequeños Gram positivos (figura 8).

Agar SS (Salmonella-Shigella), este medio lleva sales biliares las cuales inhiben a muchas Enterobacterias y microorganismos gran positivos, citrato sódico y férrico, tiosulfato y el colorante verde brillante, que permiten la visualización de microorganismos productores de sulfhídrico observándose colonias con un centro negro. El carácter diferencial se basa en la fermentación de la lactosa. Incorpora rojo fenol que permite la diferenciación de los no fermentadores de lactosa (*salmonella* y *Shigella*) como colonias incoloras, como su nombre lo dice se utilizó para identificar a la *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Shigella sonnei* s/n, la *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 creció en forma de colonias medianas, convexas con un borde claro y centro negro (producción de sulfhídrico) las cuales les dan forma a un ojo de pescado su morfología microscópica la cual corresponde a pequeños bacilos Gram negativos (figura 9). Para el caso de la *Shigella sonnei* s/n crecieron colonias pequeñas, incoloras, transparentes, irregulares, microscópicamente se observaron bacilos pequeños Gram negativos (figura 10).

Otro de los objetivos del presente trabajo fue realizar una evaluación del grado de contaminación de los extractos crudos acuosos, así como las infusiones de hojas y flores de la Manzanilla, también se le realizó esta prueba a un té comercial (bolsa) para hacer comparaciones. La planta se obtuvo fresca de un mercado de la ciudad de Morelia Michoacán, misma que les surten de cultivos de Municipios cercanos a esta Ciudad, los sobres de té utilizado corresponde a una marca no Mexicana (Zen Tea).

Al preparar el extracto las partes de la planta se lavaron pero no se desinfectaron Al observar el crecimiento del sembrado masivo del extracto crudo de Hoja se encontró un 65 % de crecimiento lo cual indica la presencia de un grado considerable de contaminación, con la Tinción de se comprobó que este crecimiento corresponde a cocobacilos Gram negativos y algunos Gram positivos

(Figura 11), en el sembrado masivo del extracto de flor obtuvo un crecimiento de 90% lo que indica que la flor tiene un grado de contaminación mayor que la hoja, en la Tinción de Gram de este extracto se observaron cocobacilos Gram negativos y en gran cantidad cocos Gram positivos (Figura 12). Como se sabe las aguas residuales utilizadas para los cultivos son una fuente de contaminación de las plantas, incluidas las comestibles, así que es una fuente de contaminación de la Manzanilla a la cual se le realizó la evaluación (Carpenter, P. 1977). Dentro de la contaminación del agua, suelo y plantas se encuentran variedad de microorganismos como: Bacterias, parásitos y virus. Entre los grupos de bacterias que pertenecen a la flora normal del agua, suelo y plantas, encontramos a las coliformes, son un grupo de Enterobacterias que tienen la capacidad de colonizar el interior de las plantas y desarrollarse como patógenos oportunistas, además poseen resistencia a los antibióticos y sobreviven por largo tiempo, entre los géneros más comunes tenemos *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Proteus* todos Bacilos Gram negativos (Herrera, T. 2012). Otro grupo común son los enterococos, son cocos Gram positivos entre los cuales están *E. faecalis* y *E. faecium*, por ultimo cabe mencionar que otro grupo contaminante de las plantas son los Bacilos Gram positivos los más comunes son *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*. (Murray, R. *et al* , 2006).

También se realizaron los sembrados masivos de té (infusión) natural de hoja y flor de la misma planta, en los cuales se obtuvieron de la infusión de la hoja un crecimiento de 25 %, en la Tinción de Gram solamente se observaron cocobacilos Gram negativos (figura 13), y en el caso de la infusión de flor hubo un crecimiento del 30%, con Tinción de Gram se demostró solamente la presencia de cocos Gram positivos (figura 14). Con lo cual haciendo comparación con los sembrados de los extractos crudos se demostró que la temperatura (100°C) a la cual se preparó el té (infusión) influyó mucho para la eliminación de la mayoría de las bacterias que habitan la planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

En el caso de la evaluación de la contaminación bacteriana de un bolsa de Té comercial, tuvo un crecimiento del 5% del área de la placa, en la tinción de Gram se observó la morfología de cocos Gram positivos que concuerda con las bacterias que se observaron en la tinción Gram de la infusión de la flor (figura 15), lo que quiere decir que estos tipos de bacteria de las que colonizan la planta, son las más difíciles de eliminar y resistentes al calor, además de que tienen resistencia al proceso de elaboración que se le da industrialmente a los tés comerciales. Lo anterior es de suma importancia ya que para la elaboración de un té de bolsa comercial lo recomendable sería utilizar agua a punto de ebullición.

Siguiendo con los objetivos de esta investigación se evaluó la capacidad antibacteriana contra cepas ATCC, de extracto crudo (EC), fracción sin pigmentos (FSP), y pigmentos acetónicos (PAC) y alcohólicos (PAL) de hojas y flor de manzanilla, estas pruebas se realizaron por medio del método de difusión en disco (método de Kirby Bauer). Una vez que se obtuvieron los resultados de estas pruebas y sabiendo así cuales cepas son sensibles a determinados extractos de la Manzanilla, se realizaron otras pruebas para determinar si estos extractos ejercen un efecto bactericida o bacteriostático y a qué tiempo mínimo de inhibición actúan sobre dichas bacterias, para obtener estos resultados se utilizó el método de Courvalin *et al* (2006), el cual gracias al análisis del aumento o disminución de absorbancias nos permite determinar tales efectos, si permanecen constantes dentro de las 24 h de incubación es bacteriostático (CBaM), si disminuye la absorbancia es un efecto bactericida (CBM).

Se comenzó con la evaluación de los extractos crudos acuosos, pues ya que en estos es donde se pueden encontrar todos los componentes de la planta, pero esto también puede interferir para la capacidad antibacteriana del componente que la tiene. Se partió de una concentración de 0.882 mg/ml para el extracto crudo de flor (ECFM) Y 0.678 mg/ml para el extracto crudo de hoja (ECHM), Para conocer esta concentración se utilizó el método de Bradford (Bradford, M. 1976), y a partir de la concentración ya conocida se realizaron diferentes diluciones (1:1, 1:2, 1:4, 1:8). Se

realizaron los antibiogramas utilizando cada una de las diluciones anteriores, en los resultados obtenidos se observó que la única bacteria sensible fue la *E. coli* ATCC 25922, ante los dos extractos, el ECFM con una CIM de 0.110 mg/ml, para el caso de los extractos crudos de las hojas (ECHM) tuvo efecto con una CIM de 0.08 mg/ml

Una vez que se obtuvieron los resultados anteriores, se procedió a probar el resto de las muestras, en el caso de los pigmentos acetónicos tanto de flor como de hoja tuvieron efecto contra 3 bacterias de las diez que se probaron, Los pigmentos acetónicos de flores (PACFM) tuvieron efecto contra *S. aureus* ATCC 27543 y *B. cereus* con una CIM de 2mg/ml, contra la *Shigella* con CIM de 0.5mg/ml. Los pigmentos acetónicos de hojas (PACHM) contra *S. aureus* ATCC 27543 CIM de 2mg/ml), *B. cereus* ATCC 14579 con CIM de 4mg/ml y para *Shigella sonnei* s/n CIM de 0.5 mg/ml.

Los pigmentos alcohólicos también presentaron efecto contra diferentes cepas de las utilizadas, los pigmentos alcohólicos de flores (PALFM) contra *S. aureus* ATCC 27543 y ATCC 25923 tuvieron efecto con una CIM de 2mg/ml, para el caso de *B. cereus* ATCC 14579, *Shigella sonnei* s/n y *P. aeruginosa* ATCC 27853 se obtuvo una CIM de 4mg/ml, y la *L. monocytogenes* ATCC 7644 mostró mayor sensibilidad con una CIM de 0.5mg/ml. Los pigmentos alcohólicos de las hojas solamente tuvieron efecto contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 con una CIM 4mg/ml la cual es mayor que la de los pigmentos de flor.

Con todos los resultados obtenidos en la pruebas anteriores se comprueba que los extractos de la Manzanilla si tienen efecto antibacteriano. Estos resultados coinciden con lo previamente reportado para el aceite esencial y extracto metanólico de esta planta contra diferentes bacterias causantes de infecciones gastrointestinales, cutáneas y causantes de otitis externa, como son *Bacillus cereus* LMG 13569, *Enterococcus faecalis* CIP 103907, *Escherichia coli* CIP 11609, *Listeria innocua* LMG 1135668, *Salmonella entérica* CIP 105150, *Shigella dysenteria* CIP 5451, *Staphylococcus aureus* ATCC 9244, *Proteus mirabilis* 104.588 CIP,

Staphylococcus camorum LMG 13567, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp. Y *Candida albicans*. (Abdoul-Latif, F. *et al* 2011; Nogueira, J, 2008).

Para el caso del extracto acuoso de la fracción sin pigmentos (FSP), se comprobó que este no tiene efecto contra ninguna de las cepas que se utilizaron, la fracción sin pigmentos no tiene efecto sobre las bacterias pues esta no tiene péptidos antimicrobianos si no que las sustancias de la Manzanilla que tienen el efecto antibacteriano están presentes en los pigmentos, en estos podemos encontrar flavonoides que son Polifenoles que pueden ser poco hidroxilados (pigmentos acetónicos) o muy hidroxilados (pigmentos Alcohólicos) (Monge E. *et al*, 1984; Avilés A. *et al*, 2008).

Dentro de los compuestos de la Manzanilla están los fenólicos bioactivos como Herniarina y umbeliferona (cumarina), ácido clorogénico y el ácido caféico (fenilpropanoides), apigenina, apigenina-7-O-glucósido, luteolina y luteolina-7-O glucósido (flavonas), quercetina y rutina (flavonoles), y naringenina (flavanona) estos se pueden encontrar en el extracto de manzanilla (Singh, O. *et al*, 2011). Con los resultados obtenidos en este trabajo se les puede atribuir a estos compuestos el efecto antibacteriano.

Una vez que se demostró que extractos de la planta y contra cuales cepas tiene efecto de inhibición, se procedió a determinar el tiempo de inhibición mínimo (TIM), así como determinar que concentración bactericida mínima (CBM) o concentración bacteriostática mínima (CBaM) se necesita contra cada cepa. Para obtener estos datos se utilizó el método de Courvalin *et al* (2006). Posteriormente se le realizó un análisis estadístico a estos resultados con el programa prisma haciendo una comparación múltiple, con un ANOVA post hoc entre las diferentes concentraciones y los controles positivos y negativos, para comprobar si tienen diferencia significativa entre sí.

En la evaluación del extracto crudo de flores y hojas de Manzanilla contra la cepa *E.coli* ATCC 25922, en la prueba de difusión en disco se observó un efecto de

inhibición, en cambio en el Método de Courvalin se observó que no tuvo disminución la absorbancia durante las 24 horas de incubación, al contrario aumentó en todas las concentraciones de las dos muestras, esto se puede explicar ya que es una prueba muy sensible y el trabajar con el extracto en medio líquido y expuesto a la luz, podría desnaturalizar los componentes de esta muestra y entre ellos los que tienen el efecto antibacteriano.

Para el caso de los pigmentos acetónicos de flores y hojas estos tuvieron efecto contra las cepas, *S. aureus* ATCC 27543, Y *Shigella sonnei* s/n, en todos los casos con efecto bacteriostático ya que la disminución de las absorbancias desde el tiempo cero hasta las 24h no tienen diferencias significativas todos con una concentración Bacteriostática Mínima (CBaM) de 2 mg/ml, contra el *B. cereus* ATCC 14579 los pigmentos acetónicos de flores disminuyeron la absorbancia aunque no significativamente en las concentraciones de 4, 2, 1 mg/ml, considerando esta última como CBaM, los pigmentos de hojas tuvieron su efecto con la concentración 2mg/ml también CBaM.

Los pigmentos alcohólicos de flores tuvieron efecto bacteriostático contra *S. aureus* ATCC 27543 con una CBaM de 2mg/ml, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 14579, *Shigella sonnei* s/n, *P. aeruginosa* ATCC 27853 con una CBaM de 4mg/ml durante las 24h de incubación. En el caso de los pigmentos alcohólicos de flores contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 en la concentración 1mg/ml tuvo un efecto bacteriostático ya que la concentración era muy pequeña y lo que permitió el crecimiento de la bacteria y en la concentración 4mg/ml tuvo un efecto bactericida ya que la disminución de la absorbancia si fue significativa durante las 24h de incubación, los pigmentos de hojas también mostraron un efecto bactericida en la concentración 4mg/ml.

Tabla 49 Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de la Manzanilla (Matricaria chamomilla).

MUESTRA	BACTERIA	CIM	CBM	CBaM
ECFM	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.110 mg/ml	-----	-----
ECHM	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.169 mg/ml	-----	0.678 mg/ml
PACFM	<i>S. aureus</i> ATCC 27543	2 mg/ml	-----	4 mg/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	2 mg/ml	-----	1 mg/ml
	<i>Shigella sonnei</i> s/n	0.5 mg/ml	-----	2 mg/ml
PACHM	<i>S. aureus</i> ATCC 27543	2 mg/ml	-----	2 mg/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	4 mg/ml	-----	2 mg/ml
	<i>Shigella sonnei</i> s/n	0.5 mg/ml	-----	2 mg/ml
PALFM	<i>S. aureus</i> ATCC 27543	2 mg/ml	-----	2mg/ml
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2 mg/ml	-----	4mg/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	4 mg/ml	-----	4mg/ml
	<i>Shigella sonnei</i> s/n	4 mg/ml	-----	4mg/ml
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4 mg/ml	-----	4mg/ml
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	0.5 mg/ml	4mg/ml	2mg/ml
PALHM	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	4 mg/ml	4 mg/ml	-----

ECFM= Extracto crudo flor de Manzanilla; ECHM= Extracto crudo de hoja de Manzanilla; PACFM y PACHM= Pigmentos acetónicos de flor y hoja de Manzanilla; PALFM y PALHM= Pigmentos Alcohólicos de flor y hoja de Manzanilla.

Los resultados de las pruebas anteriores se pueden explicar sabiendo que muchos productos vegetales inhiben el crecimiento (bacteriostático) o lisan a las bacterias (bactericida) Los compuestos pueden actuar a diferentes niveles de los microorganismos .ya sea extracelular o intracelular, pueden inhibir la actividad de enterotoxinas, en diferentes pasos de la toxina a la unión del receptor, la absorción y las alteraciones celulares que provocan (Dubreuil, D., 2013). A los Polifenoles se

les atribuye la actividad antibacteriana por la capacidad para precipitar las proteínas presentes en la membrana celular bacteriana (Maniagua et al, 2005).

Es importante mencionar que hay varios estudios sobre el aceite esencial y el extracto metanólico de la Manzanilla (Abdoul-Latif, F. *et al*, 2011; Nogueira, J, *et al*, 2008). Pero no hay información sobre estudios de la actividad antibacteriana de los pigmentos alcohólicos y acetónicos como tal de esta planta, por lo que el presente trabajo constituye el primer estudio que permite explorar los componentes activos del extracto acuoso y pigmentos de la manzanilla, que es como se utiliza en la medicina tradicional.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se puede apoyar el uso que se le da a la Manzanilla en la medicina tradicional, y así constituir un gran avance para el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias, ya sean gastrointestinales o cutáneas, así como las causantes de la otitis externa. Además de que los productos de plantas por lo general son activos contra los patógenos sin afectar a la flora normal, así se tendría un menor número de reacciones adversas. Aunque el uso más común de la Manzanilla para tratar diferentes afecciones son las infusiones acuosas, con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que, para tratar algunas infecciones, sería más efectivo utilizar extractos alcohólicos de esta planta.

X CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos así como los pigmentos acetónicos y alcohólicos de flores y hojas poseen actividad antibacteriana. La fracción sin pigmentos no presentó actividad antibacteriana, por lo tanto los componentes activos se encuentran en los pigmentos contenidos en hojas y flores. Aunque la manzanilla es utilizada para combatir infecciones causadas por bacterias, se comprobó que esta tiene una carga bacteriana, y utilizada en infusiones, esta contaminación disminuye considerablemente.

En la evaluación del grado de contaminación de extractos, la contaminación disminuyó en el extracto crudo de flor de 90% a 30% en la infusión de la misma, en extracto crudo de hoja de 65% a 25% en la infusión, el té comercial tuvo un crecimiento del 5 %, esto indica que la temperatura a la cual se prepararon las infusiones (100°C) ayuda a eliminar casi por completo la contaminación bacteriana de esta planta.

En la evaluación de la capacidad antibacteriana los extractos crudos de flores y hojas (ECFM y ECHM) tuvieron efecto contra *E. coli* ATCC 25922. Los pigmentos acetónicos de flores (PACFM) y hojas (PACHM) tuvieron efecto contra *S. aureus* ATCC 27543, *B. cereus* ATCC 14579 y *Shigella* Sonnei s/n. Los pigmentos alcohólicos de flor (PALFM) contra *S. aureus* ATCC 27543 y ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 14579, *Shigella sonnei* s/n, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *L. monocytogenes* ATCC 7644. Los pigmentos alcohólicos de las hojas tuvieron efecto contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

En la identificación morfológica, las cepas *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 25923 y la ETEC s/n cocobacilos Gram (-), se pueden identificar en el agar MacConkey. Los *S. aureus* ATCC 27543 y ATCC 25923 (cocos Gram +) se identifican en el medio sal y manitol. La *P. aeruginosa* ATCC 27853 (bacilos Gram -), *B. cereus* ATCC 14579 (Bacilos Gram (+)) y *L. monocytogenes* ATCC 7644 (bacilos Gram (+)), se identifican en el agar sangre. *S. typhimurium* ATCC 14028 y *S. sonnei* s/n bacilos Gram (-), se identifican en el medio S-S.

XI PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar pruebas bioquímicas a los microorganismos que contaminan la planta de Manzanilla para determinar con precisión qué tipo de bacteria son.
- ✓ Aislar cada uno de los pigmentos de la Manzanilla y así hacer pruebas posteriores de la actividad antibacteriana para determinar los compuestos activos.
- ✓ Comparar la composición de pigmentos de la hoja y la flor de Manzanilla.

XII REFERENCIAS

- Abdoul-Latif, F.M, Mohamed, N., Edou, P., Ali, A.A, Djama, S. O, Obame, L C., Bassolé, I.H, Dicko, M H., 2011, Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Matricaria chamomilla* L. from Djibouti. J Med Plant Res 5(9): 1512-1517. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/JMPR>.
- Alós, J.I 2003. Quinolonas. Enferm Infecc Microbiol Clín 21(5): 261-268. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X03729322?via=sd&cc=y>.
- Apella M.C, Araujo ZP., 2006. Microbiología de Agua. Conceptos básicos. En Solar Safe Water. Capítulo 2:33-50.
- Artistil, P. 2001. Manual de Farmacología Básica y Clínica. (5ta. Edición).México, D.F. ELSEVER. México. Capítulo 16: 251-269.
- Ávalos, A., Pérez, E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2: 119-145.
- Avello, L.M., Cisternas, F.I. 2010. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chile, 138: 1288-1293.
- Avilés A, Bermúdez K, Herrera ML. 2008. Efecto antidepresivo y caracterización química de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana*. Tesis de Maestría. IPN.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 4: 493-496.
- Bernal, M., Guzmán, M. 1984, El antibiograma de discos, Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. Biomédica, 4: 112-117.
- Boman, H. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu Rev Immunol 13: 61-92.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem, 72: 248-254.
- Caballero, J. 2007. Macrólidos. Revista Paceaña de Medicina Familiar, 6: 149-153.
- Cameroni, G. Ficha Técnica: Manzanilla (*Matricaria recutita*) Cadena Hierbas Aromáticas y Especies. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación. Disponible en: inta.gob.ar/.../INTA%20San%20Pedro-Sanidad_en_cultivos_intensivos.
- Carpenter, P., 1977. Microbiology. (4ta Ed.) D.F., México. Interamericana: 404-4011.
- Cartaya, O., Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales. 22(2): 5-14.
- Castañeda, J., Ortega, J., Venegas, A., et al, 2009 Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas, 18: 16-29.
- Coca, M. 2007, Péptidos antimicrobianos y plantas transgénicas resistentes a enfermedades. Phytoma España, La revista profesional de sanidad vegetal, 192: 47-53.

- Courvalin, P., Leclercq, R. and Bingen, E. 2006 Cine´tique del'activite´ bacte´ricide. In Antibiogramme. ESKA. Paris. 32:635
- Cruz, S.S.J. 2007. Más de 100 Plantas Medicinales, Medicina Popular Canaria. Monografías; Editado por: La obra social de la caja de canarias. Primera edición. Canarias: 19-41.
- Diagnóstico sobre la población en condiciones de pobreza vulnerable a los efectos de la desnutrición. 2010. SEDESOL: 6-8.
- Dubreuil DJ. 2013, Antibacterial and Antidiarrheal Activities of Plant Products against Enterotoxinogenic Escherichia coli. Toxins. 5:2009-2041, Disponible en :10.3390/toxins5112009
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, Resultados Nacionales 2012. Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaria de Salud: 14-22. ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf
- Estadísticas a propósito de... : Día mundial contra el cáncer (4 de febrero) datos nacionales. 2014. INEGI: 2-6.
- Estrategia de Cooperación con el país, México. 2005. OMS/OPS: 39-40. Disponible en: http://www.who.int/countryfocus/cooperation_strategy/ccs_mex_es.pdf?ua=1
- Finch, RG. Eliopoulos, GM. 2005. Safety and efficacy of glycopeptide antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (JAC), 55(suppl 2):ii5-ii13.
- Gupta, V., Mittal P, M., Bansal, P., Khokra, S., Kaushik, D. 2010. Pharmacological Potential of *Matricaria recutita* A Review. *IJPSDR*, 12 (1): 12-16.
- Hermann, T. 2007. Biomedicine & Diseases: Review. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. Cell Mol Life Sci, 64: 1841-1852.
- Hernández, C. Aguilera, MG. Castro, G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, (5):
- Herrera T MC, Montoya NYA. 2012. Perfil Epidemiológico de las enfermedades infecciosas intestinales. SINAVE, Secretaria de Salud. México: 15. Disponible en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Políticas_Nacionales_Salud-Mexico_2007-2012.pdf
- Informe de pobreza en México. 2012. CONEVAL: 66. Disponible: www.coneval.gob.mx/Informes/Pobreza/Informe%20de%20Pobreza%20...
- Joy, P.P., Thomas, J., Mathew, S., and Skaria, B.P. 2001. Medicinal Plants. *Tropical Horticulture Vol. 2.* (eds. Bose, T.K., Kabir, J., Das, P. and Joy, P.P.). Naya Prokash, Calcutta: 449-632
- Kaiser, V., Diamond, G. 2000. Expression of mammalian defensin genes. Leukoc Biol., vol. (68): 779-784.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J, Collins, J.J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nature reviews. Microbiology, 8: 423-433.
- Leiner, M., Ortiz, D.J.R, Avila MC. 2008. Un nuevo paradigma de la responsabilidad social corporativa, el aumento de enfermedades crónico-degenerativas en la fuerza laboral. Contaduría y administración. UNAM, vol. (225): 105-119.
- Lewington, A. 1993. Medicinal plants and plant extracts A review of their importation into Europe. A TRAFFIC International. Cambridge, UK: 1-10.

- López, L.M.T. 2002. Formas de administración más habituales de plantas medicinales. *Fitoterapia*, OFFARM, 21 (2): 122-125.
- López, S.M. Cañellas, G.C. 2012. Manual de plantas medicinales para guineas. Ministerio de sanidad y bienestar social República guinea ecuatorial. Edición 1ra. Edita: Fundación de Religiosos para la salud (FRS): 7-27.
- Managua, 2005. Plantas medicinales y otras especies útiles, diagnóstico situacional sobre la producción, industrialización y comercialización. IICA: 5-58. Disponible:http://www.iica.int.ni/IICA_NICARAGUA/Publicaciones/Estudios_PDF/Piant_Medic.pdf.
- Manrique, E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de la luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas Revistan Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*: 2-10.
- Manzanilla (*Matricaria chamomilla*). Atlas de la plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Disponible en: Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM. Disponible en:<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Manzanilla&id=7609>. Consultado octubre 2013.
- *Matricaria chamomilla* (*German chamomile*). 2008. *Alternative Medicine Review*, 13(1): 58-60.
- Mediavilla, A. Flórez, J. García-Lobo, JM. 1997. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. En: *Farmacología Humana*. Cap. 63: 1061-1083.
- Medicina Tradicional-necesidades crecientes y potenciales. World Health Organization Geneva. 2002. En: WHO policy *Perspectivas on Medicines*. Organización Mundial de la Salud. (2): 1-6.
- Meléndez, A., Vicario, I., Heredia, F. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos latinoamericanos de Nutrición*, vol. (27): 109-113.
- Monge E, Val J, Heras L. 1984. Análisis cuantitativo de pigmentos en plantas superiores por HPLC. *An. Estac. Exp. Aula Dei*. vol. (17): 60-66
- Montaña-Pérez, K., Vargas-Alvares, F., 2002. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*, 27(1): 21-27.
- Motaleb, M.A., Hossain, M.K., Sobhan, I., Alam, M.K., Khan, N. A., Firoz, R. 2011. Selected Medicinal Plants of Chittagong Hill Tracts, IUCN (International Union for Conservation of Nature), Dhaka, Bangladesh: XII-116.
- Murray, R., Rosenthal, S., Pfaller, M., 2006. *Microbiología Médica*. (5ta edición). ELSEVIER: Madrid, España. 323-338
- Nogueira, JC., Diniz, F., Lima, EO. 2008. *In vitro* antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Braz J Otorhinolaryngol*, (74):118–24.
- Ocegueda, S, Moreno, E., Koleff.P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Biodiversitas*. 62: 12-15.
- Pardo de Santayana M., Morales, R. 2006. Manzanillas ibéricas historia y usos tradicionales. *FITOTERAPIA*. 6(2): 143- 153.

- Paredes F., Roca J. 2004. Infecciones gastrointestinales, tipos, diagnóstico y tratamiento. OFFARM., (23): 1.
- Paredes, S.F., Roca, F.J.J. 2004. Infecciones gastrointestinales. Tipos, diagnóstico y tratamiento. En: *Ámbito Farmacéutico. Microbiología*. OFFARM., 23(5): 100-106.
- Paz, A.M. 2008. Principios activos en plantas medicinales y aromáticas. UIPAM. Disponible en: http://ocw.upm.es/ingenieria_agroforestal/industrial-utilization-of-medicinal-and-aromatic-plants/contenidos/temario/Unit-4/principios_activos.pdf. Citado: 8 -sep- 2014.
- Pelczar, M.J., Reid, R.D. 1980. *Microbiología*. Trad. al español por L. Hontañón y C. McGraw-Hill. México, DF.
- Pérez, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana Invest Biomed*. vol. (22): 48-50.
- Pigrau, C. 2003. Oxazolidinonas y glucopéptidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 21 (3): 157-165.
- Plantas medicinales. La diversidad Biológica en Cajamarca. Disponible en: http://www.pdrs.org.pe/img_upload_pdrs/36c22b17acbae902af95f805cbae1ec5/La_diversidad_biol_gica_en_Cajamarca_Cap.4_final.pdf.
- Programa nacional de salud 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas. Secretaria de Salud: 35. http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Politiclas_Nacionales_Salud-Mexico_2007-2012.pdf
- Quesada, H.A. 2008. Las plantas medicinales. *Revista Biocenosis*, 21(1-2): 20-23.
- Riesco JM, Gómez D y Martínez J. 2005. La Manzanilla como planta medicinal. Disponible en: http://www.iesoa.pangea.org/article.php?id_article=229 Consultada octubre 2013.
- Rivas, S.B., Sada, E., Hernández, P.R., Tsutsumi, V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 48(1): 62-71.
- Roberts, S.C., 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature chemical biology*. 3(7): 387-395.
- Rodríguez-Alvarez, M. 2002. Aminoglucósidos. *Enf Infec y Micro* 22(1): 20-30.
- Russo, R., Speranza, M. 2006. Los flavonoides en la terapia cardiovascular. *Revista Costarricense de Cardiología.*, vol. (8): 2-7.
- Salinas, P.J. Bermúdez, M.M. 1999. Principios activos y utilización terapéutica de la plantas toxicas del genero *Datura*. *Med-ULA, Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela* 5(1-4): 1-10.
- Sandoval, LH. 2010. Impacto d las enfermedades crónicas en las poblaciones pensionadas. *Instituto Nacional de Salud Pública*: 16-23.
- Sarkozy, G. 2001. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet. Med.-Czech*, 46(9-10): 257-274.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., 2005. Pplyphenoles: antioxidants and beyond. *American Society for Clinical Nutrition*.81(suppl): 215S-7S
- Schoefs, B. 2004. Determination of pigments in vegetables. *Journal of chromatography A* 1054: 217-226.

- Seija, V. Vignoli, R. 2003. Principales grupos de antibióticos. En: Temas de bacteriología y virología médica. Cap.34: 631-647.
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava, M. 2011. Chamomile (*Matricaria chamomilla*L.). An overview. Pharmacogn Rev. 5(9): 82–95.
- Téllez, G.A., Castaño, J.C., 2010. Péptidos antimicrobianos. Infectio.14(1): 55-67.
- Toledo de Oliveira, T. Nagem, T.J., Rocha Da Costa, M., MARCIANO DA COSTA L, MAGALHÃES N .M, STRINGHETA P C, QUEIROGA DE LIMA E, KLING DE MORAES G H, DA SILVA VIEIRA H I. 2004. Propiedades biológicas de los tintes naturales. Ars Pharmaceutica., 45 (1): 5-20.
- Vicente D y Pérez-Trallero, E. 2003. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enferm infecc y Microbiol Clín 28(2): 122-130.
- Vila, J., Álvarez-Martínez. M.J., Buesa, J., Castillo, J. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Enf Infecc Microbiol Clin 27 (7): 406-411.
- Villaruel, R., Huizar, R., Corrales, M., Sánchez, T., Islas, A., 2004. Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. Investigación en salud, 6 (3): 170- 179.
- Zasloff, M. 2002 Antimicrobial peptides of multicelular organism. Nature, 415: 389-395.
- Zuckerman JM. 2004. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. Infect Dis Clin N Am 18: 621-649.