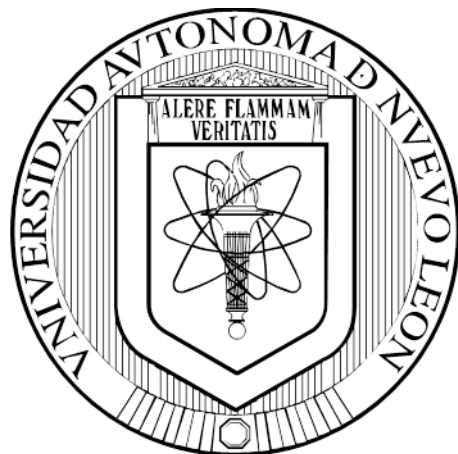


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE
PARTHENIUM INCANUM Y *NOTHOSCORDUM BIVALVE* CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA**

M. EN C. DAVID ALEJANDRO HERNÁNDEZ MARÍN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES**

JULIO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE
PARTHENIUM INCANUM Y *NOTHOSCORDUM BIVALVE* CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA**

M. EN C. DAVID ALEJANDRO HERNÁNDEZ MARÍN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES**

JULIO, 2018

“Aislamiento e identificación de compuestos de *Parthenium incanum* y *Nothoscordum bivalve* con actividad biológica”

COMITÉ DE TESIS



Dr. Eduardo Sánchez García

PRESIDENTE



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

SECRETARIO



Dra. Catalina Rivas Morales

VOCAL



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

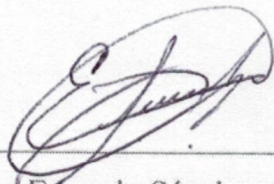
VOCAL



Dra. Catalina Leos Rivas

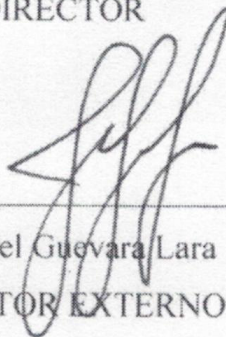
VOCAL

“Aislamiento e identificación de compuestos de *Parthenium incanum* y
Nothoscordum bivalve con actividad biológica”



Dr. Eduardo Sánchez García

DIRECTOR



Dr. Fidel Guevara Lara

DIRECTOR EXTERNO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de los estudios de Doctorado; con número de beca: 41226.

A mi familia principalmente por todo el apoyo brindado durante este tiempo.

A los Doctores; Eduardo Sánchez García, Fidel Guevara Lara y Martín Humberto Muñoz Ortega por la confianza brindada para la realización de esta investigación. Así mismo les agradezco su apoyo y asesoramiento durante estos años.

Al Maestro José Luis Carrasco Rosales por su apoyo y asesoramiento en estos años de estudios.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL; Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. Catalina Leos Rivas, Dr. Sergio Galindo, Dr. Abelardo Chávez Montes, Dr. Ezequiel Viveros y al M.C Sergio García.

Así mismo, al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología y Funcionalidad de Alimentos y al Laboratorio de Patología Molecular Experimental del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; quienes me brindaron todo su apoyo para la realización de esta tesis; Dr. Martín Muñoz Ortega, Dr. Fidel Guevara Lara, M.C Lorena Sandoval y al MC David Ibarra.

DEDICATORIA

Este trabajo de Tesis está dedicado:

A mi Madre

A mi Padre †

A mi hermano

A todos mis amigos, que en este tiempo me apoyaron; Eduardo “El Doc”, Maestro Sergio, Maestro José Luis, Doc Martín, Tere, Susy, Norma, Alex, Alondra, Damaris, Karla, Miza, Tania, Alejandra, Joel, Juan, Luis (el niño sin sentimientos), Mario, Rafa (el loco), Abraham, Armando, Tomás (Tommy), Dany, Juan Manuel, Mireya y David (El tocayo).

A ella, por regalarme unos excelentes momentos en la etapa final del Doctorado.

Gracias a todos, por estar al pendiente de mi persona y de mi trabajo de investigación.

Gracias a todos ustedes he concluido esta etapa de mi vida. Gracias de nuevo.

ESTA INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ

Laboratorio de Química Analítica, de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N. L., México; bajo la dirección del Dr. Eduardo Sánchez García.

Laboratorio de Biotecnología y Funcionalidad de Alimentos, del Centro de Ciencias Básicas, en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México; con el asesoramiento del Dr. Fidel Guevara Lara.

Laboratorio de Patología Molecular Experimental, del Centro de Ciencias Básicas, en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México; con el asesoramiento del Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
ESTA INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ	VI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XVIII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIX
RESUMEN	XX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Los metabolitos secundarios y su origen.	3
2.2 Obtención de los metabolitos secundarios.	4
2.3 Importancia de los metabolitos secundarios para el hombre.	5
2.4 Actividades biológicas con productos naturales.	6
2.4.1 Inhibición de microorganismos con extractos de plantas y/o metabolitos secundarios.	6
2.4.2 Letalidad de productos naturales utilizando <i>Artemia salina</i>.	8
2.4.3 Citotoxicidad preliminar por medio de hemólisis.	9
2.4.4 Citoprotección frente al radical libre AAPH.	10
2.4.5 Capacidad antioxidante de productos naturales por medio de los radicales libres DPPH y ABTS.	12
2.4.6 Actividad coagulante de extractos.	13
2.4.7 Evaluación citotóxica de productos naturales en línea celular normal PBMC.	14
2.4.8 Inhibición de la α-glucosidasa y el potencial de los productos naturales como antihiper glucémicos.	15
2.4.9 Actividad antiurolítica de extractos de plantas.	16
2.5 Interés en los productos naturales para la inhibición de <i>Acinetobacter baumannii</i> y sus factores de virulencia.	17

2.5.1	Importancia del microorganismo farmacorresistente.	17
2.5.2	La importancia de los factores de virulencia bacterianos.	18
2.5.3	Inhibición de factores de virulencia en bacterias con metabolitos secundarios.	21
2.6	<i>Parthenium incanum</i> y <i>Nothoscordum bivalve</i>; ¿fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica?	22
3.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	25
4.	HIPÓTESIS	26
5.	OBJETIVOS DEL TRABAJO	27
5.1	Objetivo general	27
5.2	Objetivos particulares	28
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1	Material vegetal	30
6.2	Cepa bacteriana y condiciones de cultivo	30
6.3	Identificación de la cepa utilizada por tinción de gram y pruebas bioquímicas.	30
6.4	Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos de la cepa utilizada.	31
6.5	Extracción en reflujo tipo Soxhlet y maceración estática sucesiva.	31
6.6	Rendimiento obtenido de los extractos.	32
6.7	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos	32
6.8	Obtención de la concentración mínima bactericida.	33
6.9	Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>.	33
6.10	Ensayo de hemólisis (citotoxicidad preliminar).	34
6.11	Efecto citoprotector de los extractos utilizando el radical libre AAPH como causante de la hemólisis.	36
6.12	Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de DPPH.	37
6.13	Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de ABTS.	38
6.14	Cuantificación de fenoles solubles totales.	38

6.15 Efecto de concentraciones sub-letales de la CMB sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i>; ensayo preliminar para la inhibición de biopelículas.	39
6.16 Efecto de concentraciones sub-letales de la CMB sobre la formación de biopelículas de <i>A. baumannii</i>.	40
6.17 Actividad coagulante de los extractos: tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada (TP y TTPa).	41
6.18 Determinación del grado de expresión de los genes asociados a la adhesión celular y a la producción de biopelículas.	41
6.19 Análisis por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).	45
6.20 Citotoxicidad en línea celular normal PBMC.	46
6.21 Inhibición de la enzima α-glucosidasa.	47
6.22 Actividad antiurolítica.	48
6.23 Aislamiento e identificación de compuestos activos.	49
6.23.1 Pruebas químicas realizadas a los extractos seleccionados.	49
6.23.2 Cromatografía en columna.	49
6.23.3 Bioautografía.	50
6.23.4 Cromatografía en columna para las fracciones activas.	50
6.23.5 Pruebas químicas y reveladores específicos para las sub-fracciones.	51
6.23.6 Cromatografía en capa fina preparativa (PTLC).	51
6.23.7 Espectroscopia de Infrarojos con Transformación de Fourier (FT-IR) y pruebas químicas a las bandas activas.	52
6.23.8 Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a masas (HPLC-MS) y caracterización del o los compuestos.	52
6.24 Diseño experimental.	53
7. RESULTADOS	54
7.1 Material vegetal.	54
7.2 Tinción de gram a la cepa utilizada.	54
7.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa.	54

7.4 Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos de la cepa utilizada.	56
7.5 Extracciones en reflujo tipo Soxhlet / maceración sucesiva y el rendimiento obtenido de los extractos.	57
7.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.	58
7.7 Obtención de la concentración mínima bactericida.	58
7.8 Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>.	59
7.9 Ensayo de hemólisis (citotoxicidad preliminar).	60
7.10 Efecto citoprotector de los extractos utilizando el radical libre AAPH como causante de la hemólisis.	61
7.11 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de DPPH.	64
7.12 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de ABTS.	65
7.13 Cuantificación de fenoles solubles totales.	66
7.14 Efecto de concentraciones sub-letales de la CMB sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i>, ensayo preliminar para la inhibición de biopelículas.	67
7.15 Efecto de las concentraciones sub-letales de la CMB sobre la formación de biopelículas	68
7.16 Determinación del tiempo de coagulación.	69
7.17 Determinación del grado de expresión de los genes asociados a la adhesión celular y a la producción de biopelículas.	71
7.18 Análisis por Microscopia Electrónica de Barrido de la interacción entre <i>A. baumannii</i> y extractos de plantas.	76
7.19 Citotoxicidad en línea celular normal Pbmcs.	77
7.20 Inhibición de la enzima α-glucosidasa.	78
7.21 Actividad antiurolítica.	79
7.22 Aislamiento e identificación de compuestos activos de <i>Parthenium incanum</i>.	80
7.22.1 Pruebas químicas realizadas al extracto.	80
7.22.2 Cromatografía en columna.	81

7.22.3 Bioautografía.	82
7.22.4 Cromatografía en columna para las fracciones activas seleccionadas.	82
7.22.5 Pruebas químicas y reveladores específicos para las subfracciones.	83
7.22.6 Cromatografía en capa fina preparativa (PTLC).	83
7.22.7 Espectroscopia de infrarrojos con transformación de Fourier (FT-IR) y pruebas químicas a la banda activa.	84
7.22.8 Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a masas (HPLC-MS) y caracterización de los compuestos de <i>P. incanum</i>.	85
7.23 Aislamiento e identificación de compuestos activos de <i>Nothoscordum bivalve</i>.	93
7.23.1 Pruebas químicas realizadas al extracto.	93
7.23.2 Bioautografía preliminar del extracto.	94
7.23.3 Cromatografía en Columna.	95
7.23.4 Bioautografías de las regiones activas.	96
7.23.5 Subfraccionamiento de las fracciones activas y TLC preparativas.	97
7.23.5.1 Fracciones 1 y 2.	97
7.23.5.2 Fracción 3.	99
7.23.5.3 Fracciones 5 y 6.	100
7.23.5.4 Fracciones 7 y 8.	101
7.23.6 Actividad antimicrobiana de las Regiones activas por difusión de pozo en agar.	102
7.23.7 Análisis por FT-IR de las regiones activas seleccionadas.	103
8. DISCUSIÓN	106
9. CONCLUSIONES	117
10. PERSPECTIVAS	118
11. BIBLIOGRAFÍA	119
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de los tubos de reacción para la técnica de hemólisis.	35
Tabla 2. Preparación de los tubos de reacción para la técnica de citoprotección.	36
Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores <i>forward</i> y <i>reverse</i> de los genes de interés; diseñados para la presente investigación.	42
Tabla 4. Resultados de las diversas pruebas bioquímicas para la cepa en estudio.	55
Tabla 5. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de <i>A. baumannii</i> (multidisco Marca BioRad).	56
Tabla 6. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de <i>A. baumannii</i> (multidisco Marca Multibac-ID).	56
Tabla 7. Condiciones y rendimiento de las extracciones de <i>P. incanum</i> y <i>N. bivalve</i> .	57
Tabla 8. Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.	58
Tabla 9. Concentraciones mínimas bactericidas de los extractos seleccionados.	58
Tabla 10. Dosis letales 50 (DL ₅₀) de los extractos activos y su respectiva toxicidad.	60
Tabla 11. Capacidad antioxidante de los extractos activos por la curva DPPH-Trolox.	65
Tabla 12. Capacidad antioxidante de los extractos activos cuantificados por la curva ABTS-Trolox.	66
Tabla 13. Cuantificación de los fenoles solubles totales para los extractos activos.	67
Tabla 14. Concentraciones sub-letales sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i> de los extractos seleccionados.	67

Tabla 15. Efecto de las concentraciones sub-letales sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i> (UFC/mL) a las 24 h del ensayo.	68
Tabla 16. Efecto de la cantidad de solvente utilizado para cada tratamiento (blancos) sobre el crecimiento de <i>A. baumannii</i> .	68
Tabla 17. Resultados para los ensayos de TP y TPPa.	70
Tabla 18. Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH.	81
Tabla 19. Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Observación microscópica a 100X con tinción de gram para la cepa en estudio.	54
Figura 2. Resultados de las pruebas bioquímicas; TSI, MIO, SIM, LIA y citrato de Simmons de izquierda a derecha.	55
Figura 3. Resultado negativo de hemólisis en agar sangre.	55
Figura 4. Técnica de microdilución para el extracto de <i>N. bivalve</i> Maceración MeOH para obtener su CMB.	59
Figura 5. Crecimiento de bacteriano por técnica de goteo del extracto de <i>N. bivalve</i> Maceración MeOH.	59
Figura 6. Evaluación tóxica del extracto de <i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH sobre <i>A. salina</i> .	60
Figura 7. Resultado de la prueba preliminar de hemólisis en agar ICC suplementado con sangre; 1. <i>P. incanum</i> Maceración MeOH, 2. <i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH, 3. <i>N. bivalve</i> Maceración MeOH y 4. <i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH.	60
Figura 8. Evaluación de la capacidad hemolítica para el extracto de <i>N. bivalve</i> Maceración MeOH, utilizando el radical AAPH como causante de la hemólisis.	62
Figura 9. Curva de AAPH con reactivo de Trolox (0 a 100 nmoles).	64
Figura 10. Efecto del extracto de <i>N. bivalve</i> (Soxhlet MEOH) en la formación de biopelículas antes de desteñir con Etanol al 95%.	69
Figura 11. DNA obtenido por la extracción del kit comercial.	71
Figura 12. Amplificación de los genes de virulencia y el gen constitutivo.	72
Figura 13. Concentraciones sub-letales del extracto activo de <i>N. bivalve</i> sobre <i>A. baumannii</i> , se muestran los tratamientos así como los blancos de solvente.	72
Figura 14. Separación de los RNA's obtenidos blancos tratamientos (0, 25, 50 y 75%).	73

Figura 15. Amplificación del gen constitutivo <i>recA</i> (105 pb) en los cDNA's blancos y tratamientos (0, 25, 50 y 75 % de izquierda a derecha).	73
Figura 16. De izquierda a derecha; marcador de peso moelcular, gen <i>recA</i> (105 pb) y gen <i>abaI</i> (144 pb).	75
Figura 17. Biopelículas fondo de la microplaca, después del tratamiento con las concentraciones sub-letales de la CMB del extracto de <i>N. bivalve</i> .	76
Figura 18. Microscopía electrónica de barrido entre las concentraciones sub-letales de la CMB del extracto de <i>N. bivalve</i> y el microorganismo <i>A. baumannii</i> ; (A) Control, (B) 50% de CMB, (C) 75% CMB, blancos del 50 OH (D) y 75 OH (E).	77
Figura 19. Viabilidad de las células PBMC (cristales de formazan disueltos).	78
Figura 20. Comparación de las fracciones obtenidas por TLC, eluídas cloroformo:acetona 7:3 y revelados con <i>p</i> -anisaldehído/ác. sulfúrico.	81
Figura 21. Bioautografía con zona de inhibición con Rf entre 0.50 a 0.55; cromatoplas observadas de izquierda a derecha 365 nm (UV), 254 nm y resultado positivo.	82
Figura 22. Sub-fracciones evaluadas por TLC, fase móvil cloroformo: acetona 6:2 y revelado con vainillina/ác. sulfúrico.	83
Figura 23. TLC preparativa de la sub-fracción, fase móvil cloroformo: acetona 6:2.	84
Figura 24. Grupos funcionales de la banda activa por FT-IR	84
Figura 25. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 263, presentando tiempos de retención de 23.6 y 27.7 min.	87
Figura 26. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 265, presentando tiempos de retención 26.3 y 27.9 min.	88
Figura 27. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 263; extracción por Soxhlet (partenina).	89

Figura 28. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 265; extracción por Soxhlet (coronopolina).	89
Figura 29. De izquierda a derecha; compuesto obtenido del extracto Soxhlet (referencia), fracción del gradiente 9:1 cloroformo: metanol de Soxhlet y 4 fracciones del gradiente 9:1 cloroformo:metanol de maceración. Todas muestran la presencia de partenina.	90
Figura 30. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 263, presentando tiempos de retención de 26.28 y 27.52 min.	91
Figura 31. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 265, presentando tiempos de retención de 20.48 y 26.03 min.	91
Figura 32. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 263; extracción por maceración (partenina).	92
Figura 33. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 265; extracción por maceración (coronopolina).	93
Figura 34. Bioautografía preliminar del extracto de <i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH.	94
Figura 35. Elución de la columna cromatográfica con el gradiente cloroformo.	95
Figura 36. Comparación en TLC de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del extracto de <i>N. bivalve</i> .	96
Figura 37. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la mezcla de fracciones obtenidas.	96
Figura 38. Luz UV a 365 nm.	96
Figura 39. Revelado con cloruro de cobalto.	96
Figura 40. Luz UV 365nm después del revelado.	97
Figura 41. Zonas con actividad (negro inhibición, blanco disminución).	97
Figura 42. Separación en TLC de las fracciones 1 y 2; A) revelado con cloruro de cobalto y B) visualización a la UV de 365 nm después del revelado.	97
Figura 43. TLC preparativa de la fracción 2, visualización por luz UV 365 nm.	98

Figura 44. TLC del raspado de la fracción 2, de izquierda a derecha; UV 365 nm, revelado con cloruro de cobalto, UV 365 nm después del revelado.	98
Figura 45. Subfraccionamiento de la fracción 3.	99
Figura 46. Separación de la subfracción 13; visualización con luz UV 365 nm.	99
Figura 47. Subfraccionamiento de R2 de la fracción 3, de izquierda a derecha; UV 365 nm, revelado con cloruro de cobalto, UV 365 nm después del revelado.	100
Figura 48. Comparación de las fracciones 5 y 6; análisis por UV de 365 nm y después del revelado.	100
Figura 49. Fraccionamiento de la fracción 5 por columna cromatográfica.	101
Figura 50. Comparación de las subfracciones obtenidas de la fracción 5.	101
Figura 51. Comparación de las fracciones 7 y 8; visualización a la luz UV 365 nm y después del revelado.	102
Figura 52. Separación por TLC preparativa de la Fracción 8 para recuperar la R4.	102
Figura 53. Actividad antimicrobiana para las regiones activas de <i>N. bivalve</i> ; A) R1, B) R2, C) R3 y D) R4.	103
Figura 54. Análisis por FT-IR para la región 1 activa de <i>N. bivalve</i> .	104
Figura 55. Análisis por FT-IR para la región 2 activa de <i>N. bivalve</i> .	104
Figura 56. Análisis por FT-IR para la región 3 activa de <i>N. bivalve</i> .	105
Figura 57. Análisis por FT-IR para la región 4 activa de <i>N. bivalve</i> .	105

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de hemólisis de los extractos activos en cada una de las concentraciones evaluadas.	61
Gráfica 2. Porcentaje de capacidad citoprotectora de los extractos activos en cada una de las concentraciones evaluadas.	62
Gráfica 3. Porcentaje de hemólisis causada por el reactivo de AAPH y los extractos activos en cada una de las concentraciones evaluadas.	63
Gráfica 4. Curva de la interacción del radical AAPH con reactivo de trolox (0 a 100 nmoles).	63
Gráfica 5. Curva de DPPH con el reactivo de Trolox.	64
Gráfica 6. Curva de ABTS con el reactivo de Trolox.	65
Gráfica 7. Curva de calibración para Fenoles Solubles Totales con ácido gálico (0 a 100 µg).	66
Gráfica 8. Inhibición de la formación de biopelículas por efecto de las concentraciones sub-letales de las CMB's de los extractos.	69
Gráfica 9. Expresión del gen <i>bap</i> con respecto a al control.	74
Gráfica 10. Expresión del gen <i>csuE</i> con respecto a al control.	74
Gráfica 11. Expresión del gen <i>abaI</i> con respecto a al control.	76
Gráfica 12. Porcentaje de viabilidad en células PBMC por efecto del extracto de <i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH.	78
Gráfica 13. Porcentaje de inhibición de la α -glucosidasa con las diferentes concentraciones del extracto de <i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH.	79
Gráfica 14. Porcentaje de inhibición de la nucleación con las diferentes concentraciones del extracto de <i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH.	80

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

IN	Infeción Nosocomial
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidad formadora de colonia
TLC	Thin layer chromatography (Cromatografía en capa fina)
Rf	Factor de retención
λ	Longitud de onda
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
MH	Mueller Hinton
F ₂₅₄	Indicador de Fluoresceína
UV	Ultravioleta
mAU	miliunidades de absorbancia
PLC	Preparative thin-layer chromatography (Cromatografía en capa fina preparativa)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
MS	Mass spectroscopy (Espectroscopia de masas)
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
DL ₅₀	Dosis Letal 50
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
OH	Alcohol
nm	Nanómetros
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
mg	Miligramo
m/z	Relación masa/carga

RESUMEN

Se aislaron e identificaron compuestos con actividad antimicrobiana en contra de una cepa farmacorresistente de *Acinetobacter baumannii*, esto a partir de extractos biológicamente activos de *Parthenium incanum* y *Nothoscordum bivalve*. Para ello, se llevaron a cabo diferentes extracciones del material vegetal, obteniendo 4 diferentes extractos por planta. En la actividad antimicrobiana preliminar, sólo los extractos metanólicos mostraron efecto. En la obtención de la CMB, se registraron valores de entre 7.50 ± 0.54 y 8.50 ± 0.54 mg/mL. Para la letalidad por *Artemia salina*, se observó que los extractos presentaron una DL_{50} de entre 380 y 1882 ppm. En la citotoxicidad preliminar, los extractos causaron entre el 0 y el 92.98% de hemólisis. En la protección de los eritrocitos frente al radical AAPH, los extractos registraron una citoprotección de hasta 94.58%. Con respecto a la captura de radicales, se obtuvieron valores de entre 275.55 ± 21 y 598.99 ± 4 μ moles equivalentes de Trolox/g de extracto. Para los Fenoles Totales Solubles se determinaron valores de entre 1.35 ± 0.07 y 4.13 ± 0.04 g equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de extracto. A los extractos de menor letalidad y citotoxicidad, se les determinó el efecto de las concentraciones sub-letales de las CMB's, sobre el crecimiento en *A. baumannii*, demostrando que éstas no afectaban el crecimiento, pero sí la formación de su biopelícula hasta un 41.62%; por otro lado, se estudió la actividad coagulante, determinado que el extracto de *P. incanum* afectó el TP de manera significativa ($p < 0.05$). En el extracto seleccionado de *N. bivalve*, se evaluó su efecto sobre la expresión génica de la biopelícula en *A. baumannii* y se realizó un análisis por MEB; determinando que el extracto afectó la expresión de los genes *abaI*, *bap* y *csuE*, causando una sobreexpresión de 15.4 veces, así mismo, al observar la por microscopia se logró apreciar un daño en la estabilidad y formación de su biopelícula. Así mismo, se le evaluó su citotoxicidad con células normales Pbmcs, encontrando que hasta 500 ppm no causaba daño en su proliferación celular. Estudios de la inhibición de la enzima α -glucosidasa mostró que el extracto posee una CI_{50} de 1393 ± 13 ppm y su capacidad antiurolítica mostró un valor de CI_{50} de 1141 ± 30 ppm. En el caso de *P. incanum* se aislaron e identificaron la partenina y la coronopolina. Para *N. bivalve* se identificaron de manera parcial amidas o aminas por FT-IR del extracto sometido a todas las evaluaciones biológicas antes mencionadas.

ABSTRACT

They were isolated and identified compounds with antimicrobial activity against a drug-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*, this from biologically active extracts of *Parthenium incanum* and *Nothoscordum bivalve*. To do this, different extractions of the plant material were carried out, obtaining 4 different extracts per plant. In the preliminary antimicrobial activity, only the methanolic extract showed effect. In obtaining the CMB, values between 7.50 ± 0.54 and 8.50 ± 0.54 mg/mL were recorded. For lethality by *Artemia salina*, it was observed that the extracts presented an LD₅₀ of between 380 and 1882 ppm. In the preliminary cytotoxicity, the extracts caused between 0 and 92.98% of hemolysis. Protection of erythrocytes against the radical AAPH, the extracts registered a cytoprotection of up to 94.58%. With respect to the capture of radicals, values of between 275.55 ± 21 and 598.99 ± 4 μ mol of quivalent Trolox/g extract were obtained. For Total Phenols Soluble, values between 1.35 ± 0.07 and 4.13 ± 0.04 g gallic acid equivalent per 100 g of extract were determined. To the extracts of lower lethality and cytotoxicity, the effect of the sub-lethal concentrations of the CMB's, on the growth in *A. baumannii* was determined, showing that they were not affecting the growth, but the formation of their biofilms until 41.62%. On the other hand, the coagulant activity was studied, determined that the extract of *P. incanum* affected TP significantly ($p < 0.05$). In the selected extract of *N. bivalve*, its effect on the gene expression of the biofilm in *A. baumannii* was evaluated and an analysis was performed by SEM; determining that the extract affected the expression of the genes *abaI*, *bap* and *csuE*, causing an overexpression of 15.4 times, likewise, when observing the microscopy it was possible to appreciate a damage in the stability and formation of its biofilm. Likewise, its cytotoxicity was evaluated with normal PbmC's cells, finding that up to 500 ppm did not cause damage in its cellular proliferation. Studies of the inhibition of the enzyme α -glucosidase showed that the extract has an IC₅₀ of 1393 ± 13 ppm and its anti-urolithic capacity showed an IC₅₀ value of 1141 ± 30 ppm. In the case of *P. incanum*, parthenin and coronopolin were isolated and identified. For *N. bivalve*, amides or amines were partially identified by FT-IR of the extract subjected to all the aforementioned biological evaluations.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, tales como taninos, cumarinas, terpenos, saponinas, alcaloides y flavonoides, los cuales presentan una gran diversidad de actividades biológicas. El primer paso para aislar e identificar dichos compuestos biológicamente activos, es llevar a cabo evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de todo el espécimen o parte de éste, que nos permitan conocer el potencial o alcance de la especie en estudio. Antes de comenzar las evaluaciones *in vivo* en animales, es importante realizar una serie de ensayos *in vitro* tales como su actividad antimicrobiana, potencial para inhibir factores de virulencia en microorganismos, su letalidad y/o citotoxicidad, capacidad citoprotectora, antioxidante, anticoagulante, inhibidor de enzimas y de genes de interés; por mencionar algunas de las tantas técnicas disponibles, para asegurar su actividad en un organismo completo. Ya que cada día se buscan alternativas para evitar el uso de animales de laboratorio, permitiendo así mejorar o diseñar nuevos ensayos *in vitro* constantemente.

Hoy en día, gracias al estudio y avances en las ramas de la bioquímica, bioinformática, fitoquímica y química orgánica; con el desarrollo de las técnicas de separación cromatográficas (cromatografía en capa fina y cromatografía en columna) y técnicas de identificación espectrométricas (infrarroja, HPLC-MS, RMN), la investigación en estos campos ha proveído nuevos escalafones en el descubrimiento de compuestos naturales con actividad biológica. Muchos reportes indican que este tipo de descubrimientos fitoquímicos, representan una fuente invaluable de nuevos compuestos bioactivos, y ciertamente los productos naturales juegan un papel crucial en el cumplimiento de la demanda actual de productos naturales, por lo que se requiere mayor investigación ya que muchas de estas aplicaciones permanecen aún inexploradas.

El presente trabajo se enfoca en la investigación de las plantas *Parthenium incanum* y *Nothoscordum bivalve*; para aislar e identificar metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, contenidos en sus extractos biológicamente activos. Los extractos fueron seleccionados debido a su potencial antimicrobiano, poca o nula

letalidad y/o citotoxicidad, capacidad citoprotectora en eritrocitos humanos, inhibidores de formación de biopelículas en *Acinetobacter baumannii* (técnica de cristal violeta y microscopia electrónica de barrido), no alteración de los tiempos de coagulación en plasma humano, alteración de genes asociados a la adhesión y/o formación de biopelículas de *A. baumannii*, inhibición de la enzima α -glucosidasa y su actividad antiurolítica. Todos estos criterios, permiten conocer el potencial farmacológico de las plantas en estudio, abriendo un campo de investigación, sobre la prevención y tratamiento de las enfermedades provocadas por microorganismos farmacorresistentes; ya que los principios activos naturales aislados de plantas, podrán modificar la expresión de los factores de virulencia, sin generar una presión selectiva sobre las bacterias, como ya lo hacen los antibióticos y además proveer algún otro uso terapéutico adicional al ya mencionado anteriormente.

2. ANTECEDENTES:

2.1 Los metabolitos secundarios y su origen

Los metabolitos secundarios (MS) presentes en las plantas pueden ser definidos como; compuestos que no se encuentran involucrados en los procesos fundamentales de las plantas que los sintetizan, pero tienen un papel importante en la interacción de la planta con su entorno. La producción de estos compuestos a menudo es baja (menos de 1% de peso seco) y depende en gran medida del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Namdeo, 2007). Los MS se producen en las plantas con una alta diversidad estructural, estos se almacenan en forma de mezclas complejas en concentraciones relativamente altas. Algunos MS actúan como "profármacos" que se activan enzimáticamente en caso de que la planta sufra una herida y/o infección. Las características bioquímicas y fisiológicas del metabolismo secundario están fuertemente correlacionados con su función: los MS no son productos de desecho inútiles, ya que pueden ser importantes en las plantas, ya que estos participan en la defensa contra los herbívoros, microorganismos (bacterias, hongos) y virus. Algunos MS también funcionan como moléculas señal para atraer artrópodos polinizadores o animales dispersores de semillas. Más de 100,000 MS han sido identificados por fitoquímicos, incluyendo muchos libres de nitrógeno (tales como terpenos, saponinas, policétidos, fenólicos y poliacetilenos) y otros que contienen nitrógeno (tales como alcaloides, aminos, glicósidos cianogénicos, aminoácidos no proteicos, glucosinolatos, alcaloides, péptidos y lectinas). Dentro de una sola especie vegetal se pueden producir de 5000 a 20000 compuestos primarios y secundarios, aunque la mayoría de ellos generalmente no se detectan en un análisis fitoquímico ya que se encuentran como compuestos traza (Wink, 2011).

Las plantas terrestres han desarrollado sus MS con un amplio repertorio de propiedades bioquímicas y farmacológicas; muchos interactúan con las proteínas, DNA, RNA y/o biomembranas, siendo algunas de estas interacciones moleculares muy específicas, además muchos de ellos presentan propiedades pleiotrópicas. Todas las

plantas producen MS, pero algunos de estos metabolitos tiene una distribución taxonómicamente restringida, también puede ocurrir que el mismo MS se encuentre en otros grupos de plantas que no están relacionados filogenéticamente, ya que la presencia de un MS en taxones no relacionados puede ser debido a la evolución convergente. Alternativamente, los genes que codifican las enzimas del metabolismo secundario podrían ser ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pero pueden conectarse o desconectarse en un determinado contexto filogenético. El análisis de secuencias en nucleótidos y de aminoácidos, proporcionan evidencia de que la mayoría de los genes, que codifican enzimas clave de la biosíntesis de MS tienen de hecho una amplia distribución en el reino vegetal. Se especula que estos genes se introdujeron en el genoma de la planta durante la evolución temprana por transferencia horizontal, es decir, a través de las bacterias que se desarrollaron en las mitocondrias y cloroplastos. Una distribución irregular también puede ser debido a la presencia de hongos endófitos, que son capaces de producir MS. El perfil de los metabolitos secundarios de las plantas, es el resultado de un complejo proceso que se ha desarrollado en los últimos 500 millones de años (Wink, 2011).

2.2 Obtención de los metabolitos secundarios.

La extracción es el primer paso en el análisis fitoquímico de una planta, ya que es necesario para obtener los componentes químicos deseados (metabolitos secundarios) a partir de los materiales vegetales, para su posterior separación y caracterización. Dicha extracción en el material vegetal puede incluir pasos preliminares básicos tales como; pre-lavado, secado con calor, secado por congelación y molienda para obtener una muestra homogénea, así se mejoran la cinética de la extracción analítica y se aumentará también, el contacto de superficie de la muestra con el solvente a utilizar (Sasidharan *et al.*, 2011; Pandey & Tripathi, 2014).

Se deben tomar medidas adecuadas para asegurar que los posibles componentes activos no se pierdan, se distorsionen o sean destruidos durante el proceso de extracción; pueden contribuir diversos factores como: luz, calor y exposición a ciertas sustancias

químicas. Si se ha seleccionado una planta con base a usos tradicionales, entonces se necesita preparar el extracto como se describe en la literatura y/o por el “curandero” con el fin de imitar lo más fielmente la obtención de los compuestos activos. La selección del sistema de solventes para la extracción, depende en gran medida de la naturaleza específica del compuesto bioactivo buscado. Diferentes sistemas de solventes están disponibles para extraer el o los compuestos bioactivos a partir de productos naturales. La extracción de compuestos hidrófilos (polares) usa solventes tales como agua, metanol, etanol o acetato de etilo. Para la extracción de compuestos lipófilos (no polares) se usan solventes como diclorometano, cloroformo, hexano o una mezcla de estos solventes. En algunos casos, la extracción con hexano se utiliza para eliminar compuestos que carecen de interés como la clorofila (Rodríguez-Chanfrau *et al.*, 2003; Sasidharan *et al.*, 2011; Pandey & Tripathi, 2014).

Los métodos de extracción son muy variados por lo que deben ser cuidadosamente seleccionados ya que los compuestos de interés pueden ser polares o no polares y térmicamente lábiles. Los métodos, tales como la sonicación, extracción en reflujo Soxhlet, decocción, maceración, infusión, digestión o percolación pueden ser utilizados con agua y/o con combinaciones de solventes. También existen técnicas de extracción modernas como micro-extracción en fase sólida, con fluido supercrítico, extracción líquido-presurizado, extracción asistida por microondas, la extracción en fase sólida y las técnicas mediadas por tensioactivos, que poseen ciertas ventajas tales como; la reducción en el consumo de solvente y de la muestra, la eliminación de compuestos indeseables, aumentar su concentración antes del análisis cromatográfico, la mejora en la eficiencia de la extracción, selectividad y cinética de extracción (Sasidharan *et al.*, 2011; Pandey & Tripathi, 2014).

2.3 Importancia de los metabolitos secundarios para el hombre.

A través de los siglos, los seres humanos han confiado en las plantas para las necesidades básicas como alimentos, ropa y refugio, todos producidos o fabricados a partir de matrices vegetales (hojas, maderas, fibras) y partes de almacenamiento (frutas,

tubérculos). Las plantas también se han utilizado para propósitos adicionales, como venenos de flechas y dardos para la caza, venenos para el asesinato, alucinógenos usados para propósitos rituales, estimulantes para la resistencia y supresión del hambre, así como embriagantes y medicamentos. Los productos químicos vegetales utilizados para estos últimos fines son metabolitos secundarios. Casi el 80% de la población mundial depende de medicamentos tradicionales para la atención primaria de salud, la mayoría de los cuales implican el uso de extractos de plantas (Irchhaiya *et al.*, 2014).

Las plantas son una fuente para el descubrimiento de nuevos productos con importancia médica y para el desarrollo de fármacos. Hoy en día, varios productos químicos derivados de plantas son fármacos importantes, que se utilizan en uno o más países alrededor del mundo. Los metabolitos secundarios son económicamente importantes ya que de ellos se pueden obtener sustancias como los fármacos, saborizantes, fragancias, tintes, pigmentos, pesticidas y aditivos para alimentos. Muchos de los medicamentos que se venden hoy en día son modificaciones o síntesis de las sustancias obtenidas de forma natural. La evolución en la importancia comercial de los metabolitos secundarios en los últimos años tiene como resultado un gran interés en el metabolismo secundario de las plantas, en particular en la posibilidad de modificar la producción de dichos compuestos bioactivos por medio de la tecnología de cultivo de tejidos vegetales (Hussain *et al.*, 2012).

2.4 Actividades biológicas con productos naturales

2.4.1 Inhibición de microorganismos con extractos de plantas y/o metabolitos secundarios.

Diferentes extractos con solventes orgánicos de las partes aéreas, cortezas, flores, frutos, hojas, ramas y raíces de plantas han sido investigadas con el objetivo de validar su uso en la etnofarmacología, por ello Mathebe *et al.* (2006) preparó extractos acetónicos, etanólicos, metanólicos y acuosos, de diferentes plantas; *Indigofera daleoides*, *Punica granatum*, *Syzygium cordatum*, *Gymnosporia senegalensis*, *Ozoroa insignis*, *Elephantorrhiza elephantina*, *Elephantorrhiza burkei*, *Ximenia caffra*, *Schotia*

brachypetala y *Spirostachys africana*, para evaluar su actividad *in vitro* en contra de bacterias causantes de infecciones gastrointestinales (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Salmonella typhi*). Encontrando que las CMI obtenidas de las plantas eran inferiores a 0.39 mg/mL, en especial para el extracto etanólico y acetónico de *Indigofera daleoides* y *Punica gratum*; siendo estas un posible recurso de compuestos con potencial antimicrobiano.

Valle *et al.* (2015) preparó extractos etanólicos de hojas de *Psidium guajava*, *Phyllanthus niruri*, *Ehretia microphylla* y *Piper betle* (P. betle) y estos mostraron actividad antibacteriana en contra de *S. aureus*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*; todas las cepas fueron aisladas de pacientes y presentaron diversos grados de resistencia a los antibióticos empleados durante esa investigación (ampicilina, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, imipenem, meropenem, oxacilina, penicilina y vancomicina). Por otro lado, la evaluación de los extractos ha sido determinante para la identificación de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana *in vitro*, frente a bacterias farmacorresistentes y otro tipo de microorganismos, como lo describe Feresin *et al.* (2003), donde se menciona que el extracto obtenido con diclorometano del exudado resinoso de *Baccharis grisebachii* mostró actividad contra dermatofitos (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*) y bacterias (cepas de *S. aureus* meticilina resistentes). De dicho extracto se aislaron dos diterpenos, ocho derivados del ácido p-cumárico, y dos flavonas todos ellos con actividad antimicrobiana contra dermatofitos y bacterias antes mencionados.

De igual manera, Santiago *et al.* (2013) obtuvieron extractos con diferentes solventes (ciclohexano, acetato de etilo, etanol, agua y etanol-agua) de la corteza madre de *Hymenaea stigonocarpa* y estos presentaron actividad antimicrobiana en contra de las cepas; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella entérica*, *Shigella sonnei* y *Vibrio cholerae*, todas ellas de aislados clínicos y presentando diferentes grados de

resistencia a los antibióticos. En dichos extractos se detectaron terpenos, cumarinas, flavonoides y taninos a los cuales se les atribuyen la actividad antes mencionada. Resaltando que el mayor contenido de taninos se encontró, en el extracto hidroalcohólico y éste presentaba la mayor actividad antimicrobiana.

La lista de antibióticos para tratar las infecciones nosocomiales debidas a *Acinetobacter baumannii* multirresistente es extremadamente limitada, sin embargo, los extractos de *Magnolia officinalis*, *Mahonia bealei*, *Robdosia rubescens*, *Rosa rugosa*, *Rubus chingii*, *Scutellaria baicalensis* y *Terminalia chebula* demostraron previamente su actividad inhibidora en el crecimiento de una cepa clínica multirresistente de *A. baumannii*, por ello Miyasaki *et al.* (2013) identificó los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana por fraccionamiento del extracto de cada planta, usando la cromatografía líquida de alto rendimiento. Los seis compuestos más activos fueron identificados como: ácido elágico (polifenol) en *Rosa rugosa*, norwogonina (flavona) en *Scutellaria baicalensis*, el ácido chebulágico, ácido chebulínico, corilagina (tanino) y la terchebulina en *Terminalia chebula*. El compuesto más activo fue la norwogonina con una concentración inhibitoria mínima de 128 µg/mL y una concentración bactericida mínima de 256 µg/mL frente a cepas clínicamente relevantes de *A. baumannii*. Estudios de la combinación de norwogonina con agentes antimicrobianos demostraron que la norwogonina no mejoró la actividad antimicrobiana de los antibióticos sintéticos seleccionados para ese estudio.

2.4.2 Letalidad de productos naturales utilizando *Artemia salina*.

Desde el año 1982 fue propuesto por Meyer *et al.*, un ensayo biológico para determinar la toxicidad de los extractos de plantas o sus compuestos puros, este consistía en correlacionar la citotoxicidad en las líneas celulares; 9KB y 9PS (células tumorales) con la muerte de los nauplios (larvas) de *Artemia salina*. Encontrando que 18 extractos afectaban a la *A. salina*, de los cuales 14 de ellos también lo hacían para la línea celular 9PS; la línea celular 9KB sólo seis extractos mostraron ser activos, de los cuales dos afectaban a las larvas de *A. salina*. Para el año 1991, Solís *et al.*, llevó a cabo una

variación de la técnica, demostrando podía ser llevada a cabo en una microplaca de 96 pocillos, para así utilizar una cantidad más pequeña de extractos o compuestos a evaluar. Ya para el año 2005, Sánchez y Neira; reportaron una tabla de toxicidad, de acuerdo a la dosis letal media (DL₅₀) calculada para los extractos evaluados, siendo esta, 1-10 ppm extremadamente tóxico, 10-100 ppm altamente tóxico, 100-500 ppm moderadamente tóxico, 500-1000 ppm ligeramente tóxico, 1000-1500 ppm prácticamente no tóxico y >1500 ppm relativamente inocuo. En años recientes, el uso de este ensayo se ha vuelto común para evaluar de manera preliminar la toxicidad en extractos de plantas y sus compuestos; ya que Pérez-Hernández (2015) utilizó el mencionado ensayo para evaluar la toxicidad del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Berberis trifoliata*, obteniendo un resultado de 925 ppm en su DL₅₀, considerándolo como ligeramente tóxico. Este resultado le permitió continuar con su aplicación en diversas actividades biológicas.

2.4.3 Citotoxicidad preliminar por medio de hemólisis.

Xian-guo *et al.* (1994) fue de los primeros investigadores en llevar a cabo en el ensayo de citotoxicidad utilizando eritrocitos *in vitro*; en su estudio con un extracto hidroalcohólico de *Solanum nigrescens*, evaluó la capacidad hemolítica en sangre de oveja encontrando que el extracto en diluciones de 1:1 hasta 1:1000 presentaban un grado de hemólisis similar al control positivo, atribuyendo estos resultados a una extrema sensibilidad por parte del ensayo.

Para el año 2001 (Sharma y Sharma), llevaron a cabo el ensayo de hemólisis debido al efecto que algunos compuestos causan en la membrana de los eritrocitos (lisis), ya sea de origen natural o alguno que provenga de algún microorganismo como en el caso del parásito *Plasmodium falciparum*; por ello evaluó *in vitro* el extracto y diferentes fracciones de *Calotropis procera* y de *Commiphora wightii* que presentaban actividad frente al estadio esquizonte del ya mencionado parásito. En dicho estudio se encontró que las cinéticas de hemólisis para las muestras evaluadas eran similares, a

mayor exposición de los eritrocitos con la muestra, mayor hemólisis; demostrando que a partir de los 30 min a 37°C se desarrolla la actividad hemolítica.

En años recientes la metodología ha sufrido algunas modificaciones, la utilización de volúmenes más pequeños de reacción, diversas formas de preparar la suspensión eritrocitaria a evaluar, la correlación con otras metodologías, por mencionar algunas; en el año 2009, Araújo de Oliveira *et al.* correlacionaron el grado de hemólisis con la agregación plaquetaria utilizando 12 especies de plantas provenientes de la cuenca del río Amazonas, encontrando que; es importante correlacionar la inhibición de la agregación plaquetaria con la ausencia de actividad hemolítica para los extractos de las plantas estudiadas. Esta correlación indica en general que los extractos antiagregantes identificados en ese estudio no presentaron toxicidad hacia la membrana eritrocitaria, lo que los favorece para futuras investigaciones destinadas a establecer su composición química, entre otras propiedades. En 2014, Lakshmi *et al.* evaluaron la citotoxicidad del extracto etanólico de las hojas de *Nymphaea nouchali*, modificando los volúmenes de reacción a 1 mL y probando entre 0-100 ppm de cada uno de ellos, demostrando que a esas concentraciones presentaba menos del 3% de hemólisis, por lo que menciona que su extracto no genera hemólisis a las concentraciones evaluadas. Vinjamuri *et al.* (2015) estudiaron la correlación de la hemólisis con la citotoxicidad; evaluando el extracto hexánico de las hojas de *Bridellia ferruginea* en concentraciones de 20 a 80 ng/mL, *in vitro* y utilizando la línea celular MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) por el método de MTT, encontrando que la hemólisis estuvo presente a partir de 32 ng/mL mientras que, para la línea celular a las concentraciones evaluadas no presentó citotoxicidad.

2.4.4 Citoprotección frente al radical libre AAPH.

Jiménez *et al.*, en el año 2000 iniciaron los estudios de la citoprotección utilizando el AAPH como agente causante de la hemólisis en eritrocitos de ratón; este estudio permitió conocer la capacidad de la boldina, principal alcaloide presente en *Peumus boldus* (boldo) para neutralizar al radical AAPH *in vitro*. Este alcaloide a 75 µM

logro disminuir la hemólisis causada por el radical en un 40% aproximadamente con respecto al control (AAPH). Este ensayo definió significativamente la metodología utilizada tiempo después, ya que se estudió la cantidad de AAPH necesaria (100 μ M) para causar un mayor grado de hemólisis (con respecto al control positivo, siendo este la agitación vigorosa y agua destilada), así como la cantidad de tiempo utilizado para alcanzar un mayor porcentaje de hemólisis (hasta 7 h).

Ya en años recientes la metodología ha sufrido algunas modificaciones, Benites *et al.*, (2012) utilizaron eritrocitos humanos, modificando los volúmenes de reacción, la concentración del AAPH y el tiempo de reacción; esto para evaluar la capacidad citoprotectora de 5 diferentes extractos de *Parastrephia lepidophylla*; determinando que la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de estos, se encontraba entre los 2.7 \pm 1.7 y 11.09 \pm 0.2 ppm. En el mismo año Sulaimann y Hussain, estudiaron el efecto de las antocianinas de la especie *Vaccinium myertillus* (arándano), al contrarrestar la hemólisis causada por los radicales AAPH (25 mM) y AMVN (10 mM) *in vitro*. Utilizando las concentraciones de 1, 0.1 y 0.001 mg/mL de antocianinas, evaluó su actividad frente a los radicales durante 6 h; encontraron que a mayor concentración de antocianinas mayor citoprotección, a 1 mg/mL no se presenta alta hemólisis en sus ensayos (< 17%) con respecto a los controles y variaciones de la técnica, ya que, evaluó la antocianinas frente al radical de manera inicial y después de 3 h de exposición.

Chisté *et al.*, (2014) estudiaron *in vitro* la capacidad de algunos carotenoides para reducir la hemólisis causada por el radical AAPH. Este radical a una concentración de 17 mM y los eritrocitos fueron expuestos por un lapso de 3 h. Las IC₅₀ de los carotenoides fueron; licopeno 0.24 \pm 0.05 μ M, β -caroteno 0.32 \pm 0.02 μ M, luteína 0.38 \pm 0.02 μ M y la zeaxantina con 0.43 \pm 0.02 μ M. Estos carotenoides fueron 5 veces más efectivos que la quercetina, Trolox y ácido ascórbico (controles positivos), presentando sus IC₅₀ en 2.3 \pm 0.02 μ M, 6.5 \pm 1.8 μ M y 30 \pm 6 μ M respectivamente. Estos resultados sugieren que, los carotenoides estudiados poseen un potencial importante como agentes eritroprotectores que pueden prevenir la toxicidad inducida por ROO^o en eritrocitos humanos.

2.4.5 Capacidad antioxidante de productos naturales por medio de los radicales libres DPPH y ABTS.

Los antioxidantes son moléculas que actúan en contra de los radicales libres los cuales son especies altamente reactivas (prooxidantes) presentes en los sistemas biológicos, causantes de la oxidación de biomoléculas (Carocho *et al.*, 2013); dichos efectos antioxidantes, pueden ejercer su efecto, al inicio, en la propagación, terminación, descomposición o posterior oxidación de los productos (Cardoso *et al.*, 2005).

En años recientes se ha incrementado el interés en los antioxidantes naturales, ya que estos ofrecen; mayor seguridad que los antioxidantes sintéticos, su eficacia, su gran variedad fitoquímica y la marcada idea de que los fitoquímicos naturales pueden afectar de manera positiva algunas enfermedades crónicas o incluso retardar el proceso de envejecimiento (Dorman *et al.* 2004; Marwah *et al.* 2007).

Por lo antes mencionado, se han estudiado diversas especies vegetales (principalmente de la medicina tradicional) tratando de identificar aquellas especies con una gran capacidad antioxidante y además que muestren alguna otra propiedad biológica (*in vitro* o *in vivo*). Tal es el caso de Gutiérrez *et al.* (2014) quienes estudiaron el potencial antioxidante de las plantas mexicanas; *Nicotiana glauca* Gram. (tabaquillo), *Nicotiana trigonophylla* Dunal (tabaquillo delgado), *Solanum rostratum* Dunal (Abrojo) y *Solanum nigrescens* Mart. & Gal. (Hierba Mora), todas ellas utilizadas tradicionalmente para tratar problemas de inflamación. Encontrando con la técnica de DPPH, inhibición de este radical; los extractos de *Nicotiana glauca* presentaron una actividad de entre el 64 hasta un 94%, los extractos de *Solanum rostratum* una inhibición del 60 a 92%, los extractos de *Nicotiana trigonophylla* del 19 a 57% y para los extractos de *Solanum nigrescens* del 43 a 82 %. En el caso del radical ABTS, se obtuvieron para los extractos de *Nicotiana glauca* una actividad del 77 a 97%, para los extractos de *Solanum rostratum* del 44 a 98%, para los extractos de *Nicotiana trigonophylla* del 31 a 64% y para los extractos de *Solanum nigrescens* del 45 a 63 %. Así mismo prepararon

fracciones abundantes en alcaloides los cuales presentaron menor capacidad antioxidante a la ya mencionada por cada especie estudiada.

Por otro lado Mesa *et al.*, (2011) evaluaron dos especies de *Piper*, usados como condimento y en la medicina tradicional. Las especies utilizadas fueron *P. piedecuestanum* y *P. subpedale* utilizando diferentes extractos (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol). Estos mostraron una elevada capacidad antioxidante expresada en μ moles equivalentes de Trolox/g de cada extracto. Para *P. piedecuestanum* en la técnica de DDPH los valores oscilaron entre 104 a 825; y para ABTS fueron de 898 a 1618. En el caso de *P. subpedale* en la técnica de DDPH los valores oscilaron entre 314 a 1432; y para ABTS a de 1221 a 3250.

2.4.6 Actividad coagulante de extractos.

En el año de 1998, Apachea *et al*, comenzaron con los ensayos *in vitro* de actividad coagulante mediada para extractos de plantas. En su investigación se demostró que el extracto acuoso de las hojas de *Ricinus communis* L. (higuerilla) retardó la formación del coagulo sanguíneo, utilizando las pruebas clínicas de laboratorio TP (tiempo de protrombina) y TTPa (tiempo de tromboplastina parcial activada). Esto con la finalidad de encontrar anticoagulantes y/o antiagregantes de origen natural. Es sabido que; la prolongación en los tiempos de PT es debido a la inhibición en la vía extrínseca de la coagulación y, por otra parte la prolongación en los tiempos de TTPa es por la inhibición de la vía intrínseca de la coagulación (Félix-Silva *et al.*, 2014).

En años recientes se ha estudiado la asociación de enfermedades cardiacas con la hiperlipidemia, es por ello que Alamgeer y Hira (2017), evaluaron el extractos de la planta *Grewia asiatica* en ratones y ratas; las cuales fueron organizadas en 3 grupos: el grupo control, el grupo al que se le administró fructosa al 25% (que induce a la hiperlipidemia e hipertensión) y el grupo de prueba que recibía el extracto del fruto de *Grewia asiática*. Los resultados indicaron que los extractos metanólicos y acuosos de *Grewia asiatica* L. en la dosis de 500 mg/kg presentaban efectos hipolipidémicos,

además estos aumentaron los tiempos de coagulación en la sangre de las ratas y ratones, con respecto a los tiempos obtenidos del grupo hiperlipidémico. Esto fue determinado por tiempo de trombina, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de fibrinógeno.

2.4.7 Evaluación citotóxica de productos naturales en línea celular normal PBMC.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) son una población mixta de células con núcleos redondos simples. El aislamiento de las PBMC es por centrifugación por gradiente de densidad y se pueden purificar adicionalmente para aislar tipos celulares individuales tales como células Natural Killers, células T y células B. Además, los PBMC son una rica fuente de monocitos, que pueden ser dirigidos a diferenciarse en macrófagos o células dendríticas a través del cultivo usando diversas citocinas. La fracción de PBMC de la sangre de un paciente, es una fuente importante de células cuyas funciones son el foco de una variedad de ensayos clínicos que abarcan diversos campos incluyendo la diabetes tipo 1, alergia, asma, el trasplante y la enfermedad autoinmune, por mencionar algunos.

Souza-Fagundes *et al.*, (2002) realizaron la evaluación de diferentes extractos de plantas sobre las PBMC, para evaluar; la viabilidad y proliferación de linfocitos, ya que en los humanos (así como en todos los mamíferos), el sistema inmunológico es de suma importancia debido a que es la principal defensa en contra de las infecciones, así mismo su estabilidad y eficiencia son importantes al momento del tratamiento médico (quimioterapéutico) al tratar diversas enfermedades. Estos extractos mostraron una actividad dependiente de la dosis en un intervalo entre 10 a 100 µg/mL (inhibiendo la proliferación de las PBMC), y su fraccionamiento inicial proporcionó productos naturales con actividad promisoría. Finalmente, los investigadores proponen que ensayos adicionales pueden revelar otros compuestos activos que sirvan como fuente en el desarrollo de nuevos fármacos, que interfieran en el proceso de la enfermedad relacionado con el sistema inmune.

Para el año 2016 (Santos *et al.*), fueron evaluados los extractos provenientes de una extracción con diclorometano y etanol de *Eriosema campestre* (especie nativa de Brasil utilizada para tratar enfermedades inflamatorias); contra células PBMC debido a que éstas se encuentran involucradas en los procesos inflamatorios, destacando los linfocitos T. Se encontró que, en las concentraciones evaluadas entre 12.5 a 100 µg/mL no presentaron alteración de la proliferación en las células PBMC a las 24 h de interacción; por otro lado, a los 5 días de interacción se observó un decremento significativo en la proliferación de células a las concentraciones de 50 a 100 µg/mL, siendo del 64 a 45% de viabilidad respectivamente. Al conocer las concentraciones que permitían una proliferación por varios días, evaluaron la producción de linfocitos T CD4 y CD8, involucrados en las respuestas inflamatorias; encontraron que la concentración de 25 µg/mL producía una inhibición entre el 53 a 167%. Esto, permitió corroborar la capacidad antiinflamatoria y proliferativa celular de la especie *Eriosema campestre* utilizando células PBMC.

2.4.8 Inhibición de la α -glucosidasa y el potencial de los productos naturales como antihiper glucémicos.

La diabetes mellitus es un desorden metabólico que se caracteriza por niveles anormales (altos) de glucosa en plasma, lo que causa complicaciones tales como la neuropatía diabética, la retinopatía y las enfermedades cardiovasculares. Una de las alternativas efectivas para la diabetes, en particular, la no dependiente de insulina para disminuir la hiperglucemia postprandrial, es retardar la absorción de la glucosa mediante la inhibición de enzimas hidrolizantes de carbohidratos, tales como la α -glucosidasa y la α -amilasa. La primera, es una enzima clave que se cataliza el paso final en el proceso digestivo de los carbohidratos. Es por ello que los inhibidores de dicha enzima pueden retardar la liberación de la D-glucosa de los carbohidratos complejos y retrasar la absorción de la misma, lo que provoca que los niveles de glucosa postprandrial en plasma se vean reducidos, por lo tanto, esto provoca la supresión de la hiperglucemia. En los últimos años, se han hecho esfuerzos para identificar inhibidores de la mencionada enzima, a partir de fuentes de origen natural con el objetivo de obtener un

alimento y/o compuesto para uso contra la diabetes. Con respecto a esto, se han aislado de las plantas muchos inhibidores de la α -glucosidasa, tales como flavonoides, alcaloides, terpenoides, antocianinas, glicósidos, y compuestos fenólicos, entre otros (Kumar *et al.*, 2011).

En el año 2015 (Indrianingsih *et al.*) aislaron tres compuestos provenientes de las hojas de *Quercus gilva*, la catequina, epicatequina y la tilirosida; evaluando en ellos su capacidad antioxidante y su capacidad para inhibir la enzima α -glucosidasa. En el caso de la actividad antioxidante se realizaron cuatro ensayos y los resultados fueron muy similares. En el caso de la inhibición de la α -glucosidasa, los compuestos mostraron una IC_{50} de $168.60 \pm 5.15 \mu\text{mol/L}$ para la catequina, para la epicatequina de $920.60 \pm 10.10 \mu\text{mol/L}$, en el caso de la tilirosida mostró mayor actividad de $28.36 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$, en comparación de la quercetina que fue usado como control positivo, siendo de $13.90 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$. Concluyendo que sus resultados mostraron que la *Q. gilva* es considerado una fuente muy rica de compuestos antioxidantes y antidiabéticos.

2.4.9 Actividad antiurolítica de extractos de plantas

La urolitiasis es una condición en la que se desarrollan cálculos en el sistema urinario. La formación de un cálculo renal es consecuencia de complejos procesos fisicoquímicos como la nucleación, crecimiento y agregación. El componente principal de la mayoría de los cálculos renales son los cristales de oxalato de calcio. Para el tratamiento de la urolitiasis se dispone de técnicas, consideradas eficaces, para la extracción de cálculos renales. Sin embargo, son procedimientos quirúrgicos costosos; así mismo pueden tener diversos efectos secundarios adversos. Actualmente no se dispone de ningún fármaco eficaz para su tratamiento. Los agentes terapéuticos utilizados son profilácticos y se dirigen principalmente a corregir los trastornos metabólicos subyacentes, pero la evidencia de su eficacia todavía no es convincente, además de que pueden presentar efectos secundarios adversos. A lo largo de la historia las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de patologías diversas, ya que contienen constituyentes químicos que poseen actividad biológica. Algunas de ellas han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la urolitiasis, por lo que son consideradas

una alternativa terapéutica para dicho padecimiento. Los métodos que se disponen para la investigación de la urolitiasis son técnicas *in vitro* que simulan los acontecimientos iniciales en la formación de cálculos renales, siendo empleados principalmente los métodos espectrofotométricos. Sin embargo, estos modelos comprenden los procesos biológicos que están realmente involucrados en la formación de cálculos renales. Así mismo se emplean modelos *in vivo* con ratas que son lo más ampliamente utilizados debido a que existen similitudes considerables con los humanos con respecto a estructura y fisiología del sistema urinario. Estos modelos incluyen la inducción química o la inserción quirúrgica de un cuerpo extraño en vejiga urinaria para la formación de los cálculos en animales de experimentación y evaluar la dosis efecto del principio bioactivo o fármaco (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

Es por lo anterior que en el 2015 (Pérez-Hernández *et al.*), realizaron ensayos *in vitro* con un extracto metanólico de *Berberis trifoliata* para evitar la nucleación de cristales de oxalato. Para ello mezcló soluciones de cloruro de calcio y oxalato de sodio para producir la formación de dichos cristales de manera *in vitro*; evaluaron el extracto en concentraciones de 100 a 1000 ppm y reportaron un 93% de inhibición de la formación de cristales a una concentración de 1000 ppm. En contraste el control positivo (citrato de potasio) produce el mismo efecto a una concentración de 3750 ppm. Es así que los productos naturales son una fuente alternativa para identificar metabolitos que pueden ser utilizados para tratar a las enfermedades renales.

2.5 Interés en los productos naturales para la inhibición de *Acinetobacter baumannii* y sus factores de virulencia.

2.5.1 Importancia del microorganismo farmacorresistente.

Acinetobacter baumannii es un bacilo Gram-negativo no fermentador, oxidasa negativo y catalasa positiva (Díaz, 2010), puede encontrarse en diversas fuentes ambientales como el suelo y los alimentos, incluyendo los vegetales, carne y pescado. *A. baumannii* puede ocasionalmente colonizar la piel del ser humano sano. La colonización de otros sitios del cuerpo, tales como la garganta, fosas nasales, y el tracto intestinal, se

observó raramente en individuos sanos (Vahdani *et al.*, 2011). *A. baumannii* sobrevive en objetos animados e inanimados. En el medio hospitalario se ha aislado en humidificadores, ventiladores, la piel del personal de salud, colchones, cojines y otros equipamientos. Se ha reportado una sobrevivida en superficies secas mayor a 25 días, por lo cual se le relaciona con brotes nosocomiales (Díaz, 2010).

A. baumannii es considerada actualmente como una de las bacterias Gram-negativas más importantes que causan infecciones en pacientes hospitalizados inmunocomprometidos, principalmente en las unidades de cuidados intensivos (Japoni *et al.*, 2013). Otra de sus características es la resistencia a múltiples antibióticos, por ejemplo, a todos los betalactámicos (incluyendo carbapenemos), para lo cual utiliza diferentes mecanismos, dentro de los cuales encontramos: betalactamasas de amplio espectro, metalo-beta-lactamasas, alteraciones de las proteínas ligadoras de penicilina, disminución de la permeabilidad de la membrana externa, mutación de los sitios blanco e inactivación de los sitios por enzimas modificantes (Díaz, 2010).

Los aislados clínicos han mostrado una correlación entre la resistencia a los antibióticos y la capacidad de adherirse a las superficies clínicamente relevantes, incluyendo poliestireno y células epiteliales respiratorias. Se observó que la adhesividad celular y la formación de biopelículas en el poliestireno (un polímero que se utiliza comúnmente en la fabricación de una variedad de dispositivos médicos) es mayor en las cepas que albergan el gen *bla* (*PER-1*) que en los que no albergan este rasgo genético (Gaddy *et al.*, 2009). Así mismo los genes *bap* (biofilm-associated protein), *ompA* (proteína de superficie) y *csuE* (formación de los pili) se ven involucrados en la formación de la biopelícula en la mencionada bacteria (Azizi *et al.*, 2016).

2.5.2 La importancia de los factores de virulencia bacterianos

Los mecanismos bacterianos implicados tanto en la resistencia antimicrobiana como en la virulencia son en la actualidad objeto de numerosos estudios en el ámbito de la microbiología infecciosa. Sin embargo es difícil localizar trabajos en los que se estudien conjuntamente ambos aspectos, los cuales son esenciales para entender el

comportamiento de los patógenos bacterianos y diseñar estrategias terapéuticas adecuadas para combatirlos de una manera eficaz. Para poder entender con mayor facilidad sobre mecanismos de resistencia y virulencia, es necesario conocer una serie de conceptos básicos sobre la patogénesis bacteriana. Varios son los mecanismos implicados en la «virulencia bacteriana», como la colonización, la capacidad de sobrevivir en superficies ambientales y la infección. Un factor común a los tres procesos es el «*fitness* bacteriano», definido como la capacidad de la bacteria de sobrevivir o replicarse. Además del *fitness*, otros factores que contribuyen al desarrollo de la colonización son la capacidad de adherencia a las células epiteliales hospedadoras, la resistencia a los agentes inhibitorios, la formación de biopelículas y el *quorum sensing* (QS). Respecto a la supervivencia en superficies ambientales durante largos períodos de tiempo, destacan la resistencia a desinfectantes y antimicrobianos, la utilización de diversas vías metabólicas para su crecimiento, la formación de biopelículas en superficies y aparatos invasivos, así como la respuesta QS entre bacterias. (Beceiro *et al.*, 2012).

La adherencia bacteriana es el primer paso de colonización bacteriana y se define como la unión relativa estable e irreversible de una bacteria a una superficie. Para aquellas bacterias patógenas, la adherencia es el primer estado en la patogénesis de una enfermedad. Es un proceso complejo que resulta de interacciones moleculares altamente específicas entre la bacteria y la célula blanco y que desencadena una serie de eventos bioquímicos-moleculares en cascada dentro de ambas células. La finalidad de esta acción es favorecer la invasión del hospedero, dando lugar a un nicho ecológico para la bacteria, seleccionando el sitio de infección y desarrollando la enfermedad. Las moléculas responsables de la adhesión se les conocen como adhesinas, por su estructura se clasifican en fimbriales y no fimbriales. Las moléculas sobre la superficie de la célula blanco o superficie inanimada que son reconocidas por las adhesinas se les conoce como receptores (proteínas, polisacáridos, glicoproteínas, glucolípidos). La unión adhesina-receptor puede facilitar que otros factores de virulencia sean reconocidos por sus receptores en la célula huésped y los efectos producidos se ven sumados o dependen exclusivamente del nuevo factor de virulencia (Rocha *et al.*, 2004).

El término biopelícula hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75%) y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas. El exopolímero que es producido por los mismos microorganismos, forma una matriz adherente en donde estos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos. Una de estas características es la heterogeneidad, lo que las hace organizaciones ricas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos. Se ha visto entonces, que los microorganismos al ser variados dentro de esta organización presentan diferentes microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno. Igualmente la hidrodinámica juega un papel importante en el desarrollo de la biopelícula pues estas organizaciones se desarrollan en una interfase líquido-sólido donde la velocidad del flujo que lo atraviesa influye en el desprendimiento físico de los microorganismos. Además, poseen un sistema de canales que les permiten el transporte de nutrientes y desechos; esto resulta de vital importancia cuando se piensa en modificar el ambiente que prive a los microorganismos de las moléculas necesarias para su desarrollo. Otra característica de las biopelículas es su resistencia a las defensas del hospedero y agentes antimicrobianos. Mientras que los microorganismos aislados son susceptibles a estos factores de control, las colonias organizadas e incluidas en el exopolímero forman una capa impermeable en donde sólo los microorganismos más superficiales se ven afectados. Los anticuerpos, las células del sistema inmune y los antimicrobianos no tienen acceso a los microorganismos más profundos; adicionalmente, se encuentran en un estado metabólico reducido lo que los hace menos susceptible a la acción de estos últimos. También cuando se liberan células de la biopelícula, éstas pueden viajar y depositarse en nuevos nichos de colonización manteniendo las mismas características de una biopelícula adherida a una superficie. Finalmente, los microorganismos se comunican unos con otros, en un proceso denominado *quorum sensing* que involucra la regulación y expresión de genes específicos a través de moléculas de señalización que median la comunicación intercelular. Esta característica es dependiente de la densidad celular que exista, así por ejemplo, en biopelículas con una alta densidad celular, se induce la expresión de genes de

resistencia que proveen protección y supervivencia. Similarmente, los microorganismos pueden producir sustancias para estimular la propagación de colonias e inhibir el crecimiento de otras dejando a los microorganismos más patógenos en una posición favorable dentro de la biopelícula. El conocimiento de la interacción que existe entre los diferentes microorganismos que componen y habitan una biopelícula, es un área muy estudiada por el momento pues *in vitro* se ha visto que al bloquear las moléculas involucradas en la adherencia y comunicación celular se puede inhibir el desarrollo de ellas (Betancourth *et al.*, 2004).

Los dos factores de virulencia mencionados anteriormente están ligados; ya que para la formación de biopelículas es necesaria primeramente una adhesión por parte de la bacteria a un medio biótico o abiótico.

2.5.3 Inhibición de factores de virulencia en bacterias con metabolitos secundarios

Kang *et al.* (2008) examinaron la capacidad del galato de metilo (GM) y del ácido gálico (AG), los principales compuestos en *Galla Rhois* al inhibir la proliferación de las bacterias orales y la formación *in vitro* de la biopelícula en *Streptococcus mutans*. Las actividades antimicrobianas de estos compuestos fueron evaluados *in vitro* utilizando el método de microdilución en caldo (MIC = 1 mg/mL). Estos compuestos inhibieron significativamente la formación *in vitro* de la biopelícula en *S. mutans* (GM a 1 mg/mL y AG a 4 mg/mL).

Para el 2010 Chatterjee *et al.* demostraron que varios compuestos naturales pueden ser utilizados para tratar el cólera, en paralelo a los agentes terapéuticos convencionales. En particular, las especias como el chile rojo, pimienta blanca y dulce hinojo pueden inhibir la producción del factor de virulencia TC (toxina del cólera) en *Vibrio cholerae*. Como estas especias actúan contra la expresión de la virulencia en lugar de la viabilidad hay menos probabilidad de desarrollar resistencia. Uno de los compuestos activos presentes en chile rojo es la capsaicina, que puede inhibir la producción de TC. El mecanismo de inhibición de la producción de TC por la capsaicina es probablemente debido a la inhibición de la H-NS (proteína estructural) mediada por la

transcripción de los principales genes de virulencia tales como *ctx* y los genes TCPA. El consumo regular de especias comúnmente disponibles y de bajo costo (sobre todo, de chile rojo, hinojo dulce y pimienta blanca) puede ser un posible enfoque para reducir la vulnerabilidad de la enfermedad de *V. cholerae*.

En años recientes (2014) Lee *et al.* mostraron que los ácidos ginkgólicos C15:1 y C17:1 inhiben significativamente la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 en las superficies de poliestireno, vidrio y en las membranas de nylon a 5 µg/mL; mientras que el extracto de *Ginkgo biloba* tiene efecto a 100 µg/mL. Es importante destacar que, en sus concentraciones de trabajo, los ácidos ginkgólicos y el extracto de *G. biloba* no afectaron el crecimiento bacteriano. Además, los ácidos ginkgólicos y el extracto de *G. biloba* inhibieron la formación de biopelículas en tres cepas de *S. aureus*. Los hallazgos en ese estudio sugieren que los metabolitos secundarios de las plantas, representan un recurso importante para los inhibidores de las biopelículas.

2.6 *Parthenium incanum* y *Nothoscordum bivalve*; ¿fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica?

El género *Parthenium* contiene aproximadamente 16 especies de arbustos, herbáceas perennes y anuales. La especie principal es *P. hysterophorus* (escoba amarga) la cual causa dermatitis severa al contacto, pero en México es utilizada como remedio para la malaria, la neuralgia y como un vermífugo (Ebadi, 2006); *P. hysterophorus* contiene una lactona sesquiterpénica llamada “partenina”, con actividad biológica (Shah, 2014). Del mismo modo dentro del género *Parthenium*, la especie *P. argentatum* también llamada "guayule", fue considerada una alternativa para el caucho en la Segunda Guerra Mundial (Ebadi, 2006). Para el caso de *P. incanum* (también llamada mariola), se utiliza en varios estados de México para tratar enfermedades relacionadas con enfermedades gástricas, entre ellas; constipación, diarrea, mala digestión y dolor de estómago, se usa incluso para tratar afecciones hepáticas (Kane, 2006).

La partenina, aislada de *P. hysterothorus* (Shah, 2014), presenta diversas actividades biológicas como: actividad plaguicida; frente a larvas de sexto estadio de *Spodoptera litura*, también contra adultos de *Callosobruchus maculatus* y contra el nemátodo juvenil estadio-II (J2) de *Meloidogyne incognita*, además se ha reportado que inhibe la planta de *Cassia tora* (Datta & Saxena, 2001). También se le adjudica actividad alopatógena, contra el crecimiento de *Sinapis arvensis* en condiciones de laboratorio, mostrando reducción en su crecimiento (Belz, 2008). La actividad antimicrobiana de la partenina, se evidenció contra el crecimiento de patógenos bacterianos entéricos, entre ellos *Salmonella typhi* MTCC 733, *Salmonella* Typhimurium MTCC 98, *Enterobacter aerogenes* MTCC 111, *Klebsiella pneumoniae* MTCC 109, *Escherichia coli* MTCC 739, *Proteus vulgaris* MTCC 744, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 424, *Staphylococcus epidermidis* MTCC 435, *Staphylococcus aureus* MTCC 96, *Vibrio cholera* MTCC 3905 y *Shigella flexneri* MTCC 1457 (Siddhardha et al., 2012). La actividad antipalúdica ha sido estudiada en contra múltiples etapas del parásito *Plasmodium falciparum* (Balaich et al., 2016) y la actividad citotóxica *in vitro* demostró que su exposición provoca aberraciones cromosomales en linfocitos y micronúcleos en sangre periférica de ratón (Ramos et al., 2002).

El género *Nothoscordum* Kunth comprende unas 20 especies nativas de Sudamérica que se encuentran principalmente en regiones tropicales, siendo *N. bivalve* (L.) Britton la única especie que se encuentra en Norteamérica (Souza et al., 2009). *N. bivalve* es una planta perenne de hasta 20 pulgadas de alto con flores blancas. Se ha encontrado de la región sureste de los Estados Unidos a México, Argentina, Chile y Uruguay (Howard, 2001; Richardson & King, 2011).

Existe poca información fitoquímica y medicinal del género *Nothoscordum* lo cual es una buena alternativa para el estudio de la especie *bivalve*, ya que; Hernández (2015) llevo a cabo una la evaluación de la actividad antimicrobiana con un extracto metanólico de la parte aérea obteniendo la inhibición de microorganismos farmacorresistentes. De igual manera Lazo & Ravenna (1989) evaluaron los extractos acuosos de tres especies del género *Nothoscordum* en contra de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Staphylococcus aureus*, los cuales presentaron actividad al inhibir su crecimiento. Para

la especie *gracile* en 2016 (Sidhu & Thakur) estudiaron el potencial medicinal de la especie al analizar la planta seca y molida por FT-IR para identificar el tipo de metabolitos secundarios presentes en estos, determinaron que entre la señales registradas la especie podría contener aminas, amidas, ácidos carboxílicos, alquenos, alcanos, alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos, aniones pentaborato y enlaces disulfuro.

Debido a lo anterior es de suma importancia la búsqueda de principios con actividad biológica, en *Parthenium incanum* y *Nothoscordum bivalve*, las cuales puedan ser una fuente de metabolitos secundarios de importancia en el control de *A. baumannii*, al inhibir su crecimiento y/o sus factores de virulencia y además proveer alternativas para otros usos terapéuticos benéficos.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos, aunada a la formación de biopelículas, dificulta el combate a microorganismos causantes de una gran diversidad de enfermedades. Las plantas producen una gran variedad de moléculas con propiedades terapéuticas, que han mostrado ser efectivas en controlar el crecimiento de microorganismos patógenos, así como también inhibir factores de virulencia de importancia en diversos microorganismos, es por ello que estas son una alternativa novedosa para evitar la formación de biopelículas y/o la adhesión bacteriana, previniendo así las infecciones causadas por microorganismos farmacorresistentes, como en el caso de *Acinetobacter baumannii*. En el presente trabajo se buscaron principios activos presentes en *P. incanum* y *N. bivalve* con actividad antimicrobiana, que además presenten actividades biológicas benéficas utilizando como criterios de exclusión, diferentes metodologías para la selección de los extractos con mayor bioactividad.

4. HIPÓTESIS

A partir de los extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* que no presenten letalidad y/o citotoxicidad pero sí capacidad antioxidante, capacidad citoprotectora, efecto sobre el crecimiento bacteriano, formación de biopelículas, menor tiempo de coagulación, alteración en la expresión de genes de virulencia involucrados en la adhesión y/o formación de biopelículas en *A. baumannii*, inhibición de la enzima α -glucosidasa e actividad antiurolítica; podrán aislarse e identificarse los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica.

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Aislar e identificar compuestos con actividad biológica a partir de los extractos, de *P. incanum* y *N. bivalve* que presenten actividad antimicrobiana en contra de *Acinetobacter baumannii*, actividad antioxidante, anti-biopelícula y no presenten toxicidad y/o citotoxicidad.

5.2 Objetivos particulares

1. Identificar la cepa de *A. baumannii* utilizando metodologías de microbiología clásica; tinción de Gram, pruebas bioquímicas y evaluar su resistencia a diferentes antibióticos.
2. Obtener diferentes extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* mediante reflujo tipo Soxhlet y maceración estática para evaluar su actividad antimicrobiana preliminar contra *A. baumannii*, mediante la técnica de difusión del pozo en agar.
3. Obtener la CMB de *A. baumannii* con los extractos con mayor actividad.
4. Evaluar la letalidad de los extractos mediante el ensayo de *Artemia salina*.
5. Evaluar la citotoxicidad de los extractos mediante el ensayo de hemólisis.
6. Evaluar la citoprotección de los extractos por el medio del radical libre AAPH.
7. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos por el ensayo de DPPH y ABTS.
8. Cuantificar la cantidad de fenoles solubles totales de los extractos.
9. Evaluar el efecto de las concentraciones subletales de la CMB sobre el crecimiento y la formación de biopelículas en *A. baumannii* de los extractos que no presentaron letalidad y/o citotoxicidad.
10. Determinar los tiempos de coagulación en plasma humano utilizando los extractos que no presentaron toxicidad y/o citotoxicidad.
11. Determinar el efecto de concentraciones subletales de la CMB del extracto bioactivo, sobre el grado de expresión de los genes asociados a la adhesión y/o a la formación de biopelículas en *A. baumannii*.
12. Observar por microscopia electrónica de barrido el efecto del extracto bioactivo sobre *A. baumannii*.
13. Evaluar la citotoxicidad del extracto seleccionado en células normales PBMC.
14. Evaluar la capacidad antihiper glucemiante del extracto bioactivo con la inhibición de la enzima α -glucosidasa.
15. Evaluar la capacidad antiurolítica del extracto seleccionado inhibiendo la formación de cristales de oxalato.

16. Aislar e identificar los compuestos con actividad antimicrobiana, de los extractos seleccionados de *P. incanum* y *N. bivalve* que hayan presentado mayor actividad biológica con técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS:

6.1 Material vegetal.

Para la realización de este proyecto, se colectaron 2 plantas; *Parthenium incanum* Kunth y *Nothoscordum bivalve* (L.) Britton, en los alrededores de la comunidad Casablanca, municipio de Santa Catarina, Nuevo León (25°39'11.33"N 100°42'41.09"W con un radio de 1.5 km a partir de ese punto). Las plantas fueron secadas a temperatura ambiente, trituradas en una licuadora Osterizer y almacenadas en sobres de papel manila a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco, hasta su uso. Además, un espécimen de cada planta fue prensado para su posterior identificación en el herbario de la UAA y/o UANL.

6.2 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo.

En este estudio se utilizó la cepa *A. baumannii*, de un aislado nosocomial (No. 12-443) del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Nuevo León, México. La cepa fue mantenida en tubos con Agar Mueller Hinton (MH; Difco) a 4°C. Para la activación de la cepa se procedió como indica Sánchez *et al.* (2013) pero con ligeras modificaciones; para esto, del medio de reserva se tomó una asada y se sembró en 5 mL de caldo MH. Los tubos se incubaron durante 16-18 h a 37°C. Asimismo, las cepa fue conservada en alícuotas de 0.5 mL de caldo MH a -80°C utilizando glicerol como crioprotector.

6.3 Identificación de la cepa utilizada por tinción de gram y pruebas bioquímicas.

Para corroborar la identidad de la cepa de *A. baumannii*, se llevaron las siguientes pruebas; tinción de Gram, sembrado en dilución por estría, pruebas bioquímicas de rutina como MIO, LIA, TSI, citrato de Simmons, hemólisis, catalasa y oxidasa (Constantiniu *et al.*, 2004; Dortet *et al.*, 2006; Al Shelawi *et al.*, 2014).

6.4 Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos de la cepa utilizada.

Para evaluar la susceptibilidad del microorganismo a diferentes antibióticos se llevó a cabo la metodología propuesta por Morales *et al.*, (2006) con ligeras modificaciones; para ello se activó la cepa del medio de reserva de la forma previamente descrita. Posteriormente se inocularon por extensión placas Petri con agar MH, utilizando 100 μ L de la cepa activada (1% v/v) Después de inocular el agar, se dejaron secar 5 min a temperatura ambiente, se colocaron los multidiscos Gram Negativos de la marca Multibac-ID y Bio-Rad. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Se midieron los halos de inhibición y se determinó la susceptibilidad para reportar el tipo de resistencia; resistente, intermedio y sensible que marca cada uno de los fabricantes.

6.5 Extracción en reflujo tipo Soxhlet y maceración estática sucesiva.

Para obtener los extractos de cada una de las plantas, se realizaron extracciones sucesivas de una cantidad determinada (300 g) de las plantas secas y trituradas, se inició la extracción en reflujo Soxhlet; comenzando con hexano, seguido de cloroformo y por último metanol, todo sobre el mismo material vegetal; utilizando aproximadamente 2 L de cada uno de estos solventes (Pandey & Tripathi, 2014). Las plantas se dejaron en reflujo durante 48 h con cada uno de los solventes. Después de esto, los extractos fueron concentrados hasta sequedad utilizando un rotaevaporador (Yamato BM 100). Para el caso de la maceración estática, una cantidad determinada (300 a 400 g) de las plantas secas y trituradas, se colocaron en matraces de 500 mL con un volumen de aproximadamente 300 mL de metanol, en seguida se dejaron en contacto con dicho solvente durante 24 h sin agitación y en oscuridad. Transcurrido el tiempo antes mencionado, los extractos fueron concentrados hasta sequedad utilizando un rotaevaporador (Yamato BM 100), con el metanol recuperado, se repitió la extracción por maceración por 7 d consecutivos, sobre el mismo material vegetal y se llevó a sequedad igual que el procedimiento anterior. Se determinó el rendimiento de cada una de las extracciones realizadas.

6.6 Rendimiento obtenido de los extractos.

Para determinar el rendimiento en porcentaje de cada una de las extracciones realizadas, se tomó como referencia el peso del material vegetal antes de la extracción (PI) y el peso del extracto obtenido después de la extracción y/o tratamiento (PE), para lo cual se utilizó la fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

6.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Para evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos sobre el crecimiento de *A. baumannii*, se utilizó la metodología de difusión del pozo en agar, propuesta por Sánchez *et al.*, (2013). La cual consiste en sembrar por extensión, con la ayuda de un asa de Driglasky, 100 µL de las cepas previamente activadas, sobre placas Petri con agar MH. Posteriormente se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo estéril invertido (aprox. 6 mm de diámetro); en seguida el agar fue retirado con la ayuda de una espátula estéril. Para los extractos obtenidos con el solvente polar (Metanol) se agregaron 100 µL de los extractos (50 mg/mL) en cada pozo; para el caso de los extractos obtenidos con solventes no polares (Hexano y Cloroformo), se utilizó la técnica de difusión con discos de papel filtro, los cuales fueron impregnados con 50 µL de los extractos (50 mg/mL), se dejaron a temperatura ambiente durante 15 min para evaporar el solvente y posteriormente con la ayuda de unas pinzas de disección estériles, se colocaron sobre el agar MH previamente inoculado; las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. El efecto antimicrobiano del extracto fue evidenciado mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo o del disco de papel filtro. Se utilizaron controles con los solventes utilizados para la obtención de los extractos.

6.8 Obtención de la concentración mínima bactericida.

Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el método propuesto por Sánchez *et al.*, (2010) con ligeras modificaciones. En este caso se inocularon 30 mL de caldo MH, con 300 μ L (1%) del cultivo previamente activado como ya se mencionó anteriormente. El cultivo fue homogenizado manualmente y posteriormente se tomaron diferentes volúmenes del medio activado y fueron colocados en una microplaca de 96 pozos, donde además se agregaron diferentes concentraciones de los extractos seleccionados, el volumen final de cada pozo fue ajustado a 200 μ L (no sobrepasando un 10% de solvente a volumen final). Las placas se incubaron a 37°C por 24 h; después del tiempo de incubación se tomaron 10 μ L de cada pozo donde no se observó crecimiento aparente y se realizó la técnica de siembra descrita por Miles y Misra, que consiste en una siembra por goteo (25 μ L) sobre el agar MH. Las placas se incubaron de acuerdo con la metodología anteriormente descrita. Pasado el tiempo de incubación se determinó la CMB, siendo definida como la concentración más baja del extracto que inhibe completamente el crecimiento microbiano. Fue utilizado el solvente en los cuales fueron resuspendidos los extractos, como controles (metanol).

6.9 Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*.

Para el ensayo de letalidad de *Artemia salina* se procedió como describen la metodologías de Meyer *et al.* (1982), Solís *et al.* (1993), Sánchez y Neira (2005), Pérez-Hernández *et al.*, (2015) con ligeras modificaciones; para la incubación de huevecillos de *A. salina*, se preparó agua de mar artificial: se pesaron 40 g de sal de mar (Coralife Scientific Grad Marine Salt) y 0.006 g de levadura de cerveza (Pronal Ultra) posteriormente se aforaron a un litro con agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.8. El procedimiento se realizó incubando 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) en el agua de mar artificial, colocándolos en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm, para comunicar ambas secciones; el sistema se mantuvo en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo iluminado con una

lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz. A las 24 h los nauplios eclosionados se encontraban en la sección iluminada y fueron mantenidos en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29°C por 24 h más.

Antes de comenzar el ensayo con los extractos, se determinó la cantidad de solvente tolerable para las artemias; con lo cual, se realizaron los cálculos adecuados para determinar las concentraciones más adecuadas para el ensayo. Para llevar a cabo la determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀), se tomaron 10 individuos, los cuales se depositaron en cada pozo de una microplaca (6 repeticiones por extracto). Posteriormente ajustó el volumen final de los pozos a un volumen final de 200 µL con los extractos a probar. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 100 y 300 ppm y agua de mar sin ningún tratamiento como control negativo. Esto se llevó a cabo por duplicado dando un total de 120 individuos por tratamiento. Después de aplicados los extractos, la placa se incubó por 24 h a 25°C. Posteriormente se contaron las artemias vivas con ayuda de un estereoscopio (Leica EZ4). Y finalmente, utilizando el método Probit se determinó la DL₅₀.

6.10 Ensayo de hemólisis (citotoxicidad preliminar).

Como evaluación preliminar de la actividad hemolítica (Sotheeswaran, 1988); en una caja con agar ICC suplementado con el 5% de sangre defibrinada, se realizaron pozos de la forma previamente descrita para la evaluación antimicrobiana preliminar, posteriormente se agregaron 100 µL de extracto a cada pozo (100 mg/mL); todo esto en condiciones de esterilidad. La caja ya con los extractos se dejó a temperatura ambiente por un lapso máximo de 72 h. El resultado positivo, se reportó la presencia de un halo de hemólisis y la ausencia de este como negativo. Seguido a esto se realizó la evaluación de la capacidad hemolítica por un método espectrofotométrico basado en las metodologías de Araújo de Oliveira *et al.* (2009); Lakshmi *et al.* (2014) y Vinjamuri *et al.* (2015), con modificaciones:

Para lo cual, se obtuvieron 4 mL de sangre de un voluntario sano, con ayuda del sistema Vacutainer en tubos con EDTA. La sangre fue centrifugada a 3000 rpm por 10

min a 25°C, para retirar el plasma con ayuda de una pipeta Pasteur. La sangre fue lavada al menos en 3 ocasiones con amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4), después de los lavados se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración aproximada del 5 % en PBS, (aproximadamente 0.750 µL de la suspensión de eritrocitos, aforados a 15 mL con PBS).

Para preparar los extractos, fracciones o compuestos a evaluar estos deben ser resuspendidos en PBS; si esto no es posible, pueden utilizarse solventes. Deben considerarse como blancos del ensayo los volúmenes de solvente utilizados para cada concentración de extracto. Como controles se utilizaron agua destilada y PBS, siendo positivo y negativo respectivamente. El volumen final de la reacción fue llevado a 1250 µL. La Tabla 1 explica la preparación de los extractos, así como los blancos y controles:

Tabla 1. Preparación de los tubos de reacción para la técnica de hemólisis.

	PBS (µL)	Agua destilada (µL)	Solvente (µL)	Sangre al 5% (µL)	Volumen final (µL)
Control +	-----	1000	-----	250	1250
Control -	1000	-----	-----	250	1250
Muestra a la concentración deseada	1000	-----	-----	250	1250
Blanco de la Muestra (Solvente)	Variable	-----	Variable	250	1250

Al terminar de preparar los tratamientos, estos se incubaron a 37±0.5°C por 30 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes y 250 µL de estos, se colocaron en una microplaca de 96 pocillos. El sobrenadante fue leído a una densidad óptica (DO) de 540 nm (longitud de onda donde reacciona la hemoglobina) en un lector de microplacas (Epoch).

Los resultados fueron reportados en porcentaje de Hemólisis, a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Hemólisis} = \frac{(\text{Abs Muestra} - \text{Abs Control negativo})}{(\text{Abs control positivo} - \text{Abs Control negativo})} \times 100$$

6.11 Efecto citoprotector de los extractos utilizando el radical libre AAPH como causante de la hemólisis.

La técnica que se utilizó es muy similar a la de hemólisis previamente mencionada, con algunas modificaciones (Benites *et al.*, 2012; Sulaiman y Hussain, 2012 y Chisté *et al.*, 2014) en este caso, la suspensión de eritrocitos fue preparada al 10% y se utilizó el radical (causante de la hemólisis) AAPH a una concentración de 150 mM, el volumen final de la reacción se ajustó a 1000 μL . La Tabla 2 resume la preparación de los extractos, así como los blancos y controles.

Tabla 2. Preparación de los tubos de reacción para la técnica de citoprotección.

	PBS (μL)	Solvente (μL)	Sangre 5% (μL)	AAPH 150 mM (en PBS)	Volumen Final (μL)
Control +	375	-----	250	375	1000
Control -	750	-----	250	-----	1000
Muestra a la concentración deseada	Variable	-----	250	375	1000
Blanco de la Muestra (Solvente)	Variable	Variable	250	375	1000

Posteriormente a la preparación de los tratamientos, blancos y controles; estos fueron incubados por un lapso de 300 min a 300 rpm, en una incubadora con agitación (Luzeren® Shaker) a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Al terminar el tiempo de incubación los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm por 5 min a 4°C , posteriormente, se recuperó el sobrenadante y de este se colocaron 250 μL en una microplaca de 96 pozos. El análisis del

sobrenadante fue leído a una DO de 540 nm (longitud de onda donde reacciona la hemoglobina) en un lector de microplacas (Epoch).

Los resultados fueron reportados como porcentaje de capacidad citoprotectora de los extractos, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de hemólisis} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Abs de la muestra} - \text{Abs control negativo}}{\text{Abs control positivo} - \text{Abs control negativo}} \right) \times 100 \right]$$

6.12 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de DPPH.

Para este ensayo, se realizó lo descrito por Amador-Rodríguez *et al.*, (2015), con ligeras modificaciones; primero se preparó una solución en metanol, del radical DPPH a una concentración de 1.3 mM, después se realizó una dilución decimal del radical quedando a una concentración de 0.13mM (solución de trabajo). Enseguida se preparó una solución de Trolox a 10 mM y después fue diluida a 1 mM (solución de trabajo, ambas en Metanol). La reacción se llevó a cabo mezclando 600 µL de la solución de trabajo de DPPH con 100 µL de diferentes diluciones del Trolox (0 a 35 µM) para realizar una curva estándar, con cantidades finales de 0 a 35 nmoles. Los tubos se incubaron en completa oscuridad durante 20 min y para después ser leídos a 515 en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, USA). Para la evaluación de los extractos, se mezclaron 100 µL de diferentes diluciones de estos (en metanol), con 600 µL de solución de trabajo de DPPH, se incubaron de igual manera en oscuridad y después fueron leídos a una DO de 515 nm. Las absorbancias de las muestras seleccionadas fueron aquéllas que se encontraban dentro de la curva estándar previamente realizada. Con la ecuación de la recta obtenida, se calcularon los equivalentes de Trolox correspondientes a las muestras analizadas.

6.13 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de ABTS.

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología de Iqbal *et al.*, (2015) con ligeras modificaciones; para esto se preparó una solución del radical ABTS a una concentración de 7.4 mM y una solución de persulfato de potasio a 2.6 mM. En seguida se mezclaron los reactivos en una proporción 1:1 y se dejaron reaccionar durante 12 a 16 h a 25°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se preparó la solución de trabajo de ABTS, mezclando aproximadamente 1.5 mL del reactivo ABTS y 48.5 mL de metanol, ajustando a una absorbancia de 1.00 ± 0.05 a una DO de 734 nm. Se realizaron curvas ABTS-Trolox como se mencionó anteriormente (0 a 35 nmoles de Trolox), a un volumen final de 1500 μ L; siendo 1400 μ L de ABTS y 100 μ L de las diferentes concentraciones de Trolox. Los tubos se dejaron reaccionar por 30 min en oscuridad y posteriormente fueron leídos a 734 nm. Para la evaluación de los extractos, se mezclaron 100 μ L de diferentes diluciones de estos (en metanol), con 1400 μ L de solución de trabajo de ABTS, se incubaron de igual manera en oscuridad y después fueron leídos a una DO de 734 nm. Las absorbancias de las muestras seleccionadas fueron aquellas que se encontraban dentro de las curvas realizadas. Con la ecuación de la recta obtenida, se calcularon los equivalentes de Trolox correspondientes a las muestras analizadas.

6.14 Cuantificación de fenoles solubles totales.

Al igual que en las evaluaciones antioxidantes este procedimiento se llevó a cabo en penumbra. Se procedió como indica Amador-Rodríguez *et al.* (2015); para esto, se prepararon una curva estándar utilizando tubos (1 mL de metanol al 30%) con diferentes concentraciones de ácido gálico (0-80 μ g/mL), enseguida, se agregaron 125 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 2 N a cada tubo y se agitaron manualmente. Los tubos se dejaron reposar durante 6 min para posteriormente agregar 1.25 mL de carbonato de sodio al 7% y finalmente se añadieron 625 μ L de agua destilada a cada tubo, para completar la mezcla final de reacción a 3 mL. Los tubos fueron incubados durante 90 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo la absorbancia fue leída a una DO de 757 nm. Estos resultados fueron graficados para construir la curva estándar y realizar el

análisis de regresión correspondiente. Para la evaluación de los extractos de las plantas analizadas, se mezclaron 1 mL de diferentes diluciones de estos (en metanol al 30%), con el resto de los reactivos como se explica anteriormente; se incubaron de igual manera en oscuridad y después fueron leídas las absorbancias a 754 nm. Las absorbancias de las muestras seleccionadas fueron aquellas que se encontraban dentro de las curvas realizadas. Con la ecuación de la recta obtenida, se calcularon los equivalentes de ácido gálico correspondientes a las muestras analizadas.

6.15 Efecto de concentraciones sub-letales de la CMB sobre el crecimiento de *A. baumannii*; ensayo preliminar para la inhibición de biopelículas.

Se utilizaron las concentraciones sub-letales, correspondientes al 25, 50 y 75 % de la CMB obtenida de los extractos activos. Al igual que la CMB se utilizaron microplacas de 96 pozos; a los cuales se les agregaron las concentraciones antes mencionadas y una cantidad de cepa activada para ajustar un volumen final de 200 μ L, las placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Para el conteo microbiano se llevó a cabo el método de microdilución utilizado por Ravishankar *et al.* (2008), con algunas modificaciones; donde se tomó una alícuota de 20 μ L de los pozos, tras haber transcurrido el tiempo de exposición del extracto con la bacteria. El volumen antes mencionado, fue sometido a diluciones decimales seriadas con 180 μ L de solución salina fisiológica estéril (0.85% NaCl), para obtener un volumen final de 200 μ L. En seguida de cada dilución se tomó una alícuota (20 μ L), con la que se realizó una siembra por goteo. Las gotas sobre el medio de cultivo se dejaron impregnar por 15 min para después ser incubadas en las condiciones previamente descritas. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias y el resultado se expresó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Como controles de crecimiento se utilizaron las cepas que no tuvieron contacto con el extracto y las cepas incubadas con el volumen de solvente utilizado para los extractos.

6.16 Efecto de concentraciones sub-letales de la CMB sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii*.

Para evaluar la inhibición en la formación de biopelículas en *A. baumannii*, fueron utilizados los extractos que no presentaron toxicidad ni citotoxicidad, además de una marcada citoprotección. La metodología fue realizada según Hassan *et al.*, (2015); la bacteria previamente activada en medio MH (1×10^9 UFC/mL), fue colocada en una microplaca de 96 pozos con un volumen de 180 μ L, más 20 μ L de las concentraciones sub-letales de los extractos seleccionados. Como control negativo fue utilizada la bacteria sin tratamiento de extracto. Así mismo se colocaron blancos de lectura tales como; pozos con sólo medio de cultivo y medio de cultivo más las concentraciones de extracto evaluadas (sin bacteria). Seguido a esto las microplacas fueron incubadas por 48 h a 37 ± 0.5 °C. Transcurrido el tiempo, las células planctónicas fueron removidas con mucho cuidado a otra microplaca con ayuda de una micropipeta, la cual se leyó a una DO de 600 nm, En seguida, para teñir las biopelículas formadas, se agregaron 220 μ L de cristal violeta al 0.1% y se dejaron teñir por 30 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el colorante fue retirado por vertido rápido; después la microplaca fue lavada en 3 ocasiones con agua destilada, con ayuda de una micropipeta multicanal. Los restos de humedad de la microplaca fueron eliminados colocándola en una estufa, por un lapso de 1 h a 55 ± 1 °C. Finalmente se agregaron 200 μ L de etanol al 95% para desteñir a las biopelículas formadas. La lectura se llevó a cabo en un lector de Microplaca (Epoch) a una DO de 570 nm. El porcentaje de inhibición en la biopelícula se determinó usando la siguiente formula (Mohsenipour y Hassanshahian, 2015):

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{(Abs \text{ CN} - Abs \text{ C}) - (Abs \text{ T} - Abs \text{ CT})}{(Abs \text{ CN} - Abs \text{ C})} \right) \times 100$$

Dónde: Abs del control negativo: caldo con bacteria a 570 nm. (Abs CN)

Abs control: solo medio de cultivo a 570 nm. (Abs C)

Abs del tratamiento: extracto y caldo con bacteria a 570 nm. (Abs T)

Abs control del tratamiento: extracto y caldo sin bacteria a 570 nm. (Abs CT)

6.17 Actividad coagulante de los extractos: tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada (TP y TTPa)

De igual manera que el ensayo anterior, tan sólo fueron sometidos aquellos extractos que no presentaron toxicidad ni citotoxicidad, además de una marcada citoprotección.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de un voluntario sano utilizando tubos Vacutainer con citrato de sodio al 3.2%. La sangre obtenida fue centrifugada a 13,000 rpm durante 5 min para recuperar el plasma. Después se agregaron diferentes cantidades de los extractos para obtener una concentración final de los mismos de 1000 y de 500 ppm (980 μ L de plasma más 20 μ L del extracto y 990 μ L de plasma más 10 μ L de extracto, para completar 1 mL). Para el tiempo de protrombina (TP), el reactivo TP Excel y 100 μ L del plasma tratado se precalentaron por separado a $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ a durante 2 min en un coagulómetro, después del tiempo se añadieron 200 μ L del TP Excel al plasma y el temporizador fue activado. El coagulómetro registró el tiempo hasta la formación del coágulo. Para el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), se añadieron 100 μ l de reactivo TTPa S precalentado ($37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) al plasma tratado, se activó el temporizador y se incubó la reacción en el coagulómetro durante 5 min a $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Después de esto, se añadieron 100 μ L de cloruro de calcio 0.025 M precalentado. El coagulómetro registró el tiempo hasta la formación del coágulo. Para el análisis estadístico, se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas entre los controles y los tratamientos ($p < 0.05$) (Karim *et al.*, 2013).

6.18 Determinación del grado de expresión de los genes asociados a la adhesión celular y a la producción de biopelículas.

Para esto se llevó a cabo la selección de los genes: *bap*, *ompA* y *csuE* debido a su importancia en la resistencia y formación de biopelículas de la mencionada bacteria y además se seleccionó como gen constitutivo a *recA* (recombinación y reparación del DNA) (Azizi *et al.*, 2016). A continuación, se llevó acabo trabajo en *in silico* por medio

de herramientas bioinformáticas; primero se buscaron las secuencias de los mencionados genes en la secuencia almacenada en el NCBI del genoma CP015364 de una capa aislada de *A. baumannii* del Hospital Univeristario de (Castro-Jaimes *et al.*, 2016), esto con ayuda de la herramienta BLAST, se alineó la mencionada cepa con aquellas que albergaban dichos genes de interés (LC014653, KT717635, AY241696, EU334497 y EU332799). Al constatar la presencia de las secuencias dentro del genoma de referencia, se utilizó el software PrimerQuest Tool (IDT Integrated DNA Technologies, www.idtdna.com) para el diseño de los primers, estos fueron diseñados con una temperatura de alineación semejantes y no mayores a un peso de 150 pb para el amplicón, finalmente se corroboró su diseño con la herramienta AmplifX.

En la Tabla 3 se observan las secuencias de los primer´s diseñados para cada uno de los genes de virulencia, así como para el gen constitutivo.

Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores *forward* y *reverse* de los genes de interés; diseñados para la presente investigación.

Gen	Secuencia Forward 5'→3'	Secuencia Reverse 5'→3'	Tamaño de amplicón (pb)	Temperatura de alineación °C
* <i>csuE</i>	TGGAAGTACGGTAATTGAGAGTG	TTCTTTGAGAGTCCTGGGTTTAG	102	55
* <i>bap</i>	GCCAGCGATGTATTGGTAGT	GGCTCAGCTGTTCCACTAAA	107	55
* <i>ompA</i>	GGTACACGTGGTAACTCAGAAG	CGAGCTTCAGTACGAAGAGATAAA	98	55
** <i>RecA</i>	CGTTCAGGCGCAATTGATTTA	CGCTTGTAGACCCATATGAGAG	105	55

* Genes de interés; ** Gen constitutivo.

Para realizar el análisis de expresión de genes de virulencia se extrajo el DNA bacteriano con ayuda del kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. La pureza y concentraciones fueron evaluadas con un equipo nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific); así mismo se llevó a cabo un una corrida en gel de agarosa con las siguientes características; gel de agarosa al 2.5X, buffer TAE 1X a 90v por 1:30 h, para observar la pureza del DNA obtenido.

En seguida se llevó a cabo un PCR convencional para determinar la presencia de los genes *recA*, *bap*, *csuE* y *ompA* dentro de la secuencia del microorganismo, para lo cual los primers se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una concentración de 0.1 ng/ μ L y el DNA a 50 ng/ μ L. Las temperaturas de fusión (TM) se establecieron a 58°C, y se preparó una mezcla de reacción que contenía; 2 μ L de Buffer (RED Taq), 1 μ L Primer Forward (1:20), 1 μ L primer Reverse (1:20), 1 μ L de templado de DNA (1:5) y 5 μ L de agua libre de nucleasas; para dar un volumen final de 10 μ L. Las condiciones establecidas para el PCR fueron; 1 ciclo de 95°C por 5 min (desnaturalización inicial), enseguida 95°C por 45 s (desnaturalización), 58°C por 45 s (alineamiento), 72°C por 12 s (elongación) por un total de 40 ciclos y finalmente un ciclo de 72°C por 3 min (elongación final). Al terminar la reacción en el termociclador, las muestras de DNA fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis. Posteriormente, se llevó a cabo un gel de agarosa, con las características anteriormente descritas.

Una vez que se corroboró la amplificación de los genes de interés; se llevó a cabo la interacción de la bacteria con las concentraciones sub-letales del extracto seleccionado, lo anterior para realizar la extracción de RNA, y evaluar la expresión de los genes de interés (qRT-PCR).

Para determinar la expresión de genes, 3 mL de cada tubo de interacción fueron centrifugados por 5 min a 14000 rpm, después el pellet obtenido fue lavado con PBS pH 7.4 (2X). Al pellet se le agregaron 100 μ L de una solución de lisis que consistió en 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA y 1 mg de lisozima, la solución se mezcló con ayuda de un vortex por 2 min, en seguida se agregaron 0.5 μ L de una solución de SDS al 10% y nuevamente se mezcló con agitación por vortex durante 2 min. Las células fueron incubadas por 5 min a temperatura ambiente, en seguida se llevó a cabo la extracción del RNA por medio del kit SV Total RNA Isolation System (Promega), para lo cual se añadieron 400 μ L de buffer de lisis y se mezcló con ayuda de un vortex por 2 min. Enseguida se centrifugaron los tubos a 4 °C por 10 min a 10,000 rpm. Mientras tanto las columnas de purificación del RNA, fueron activadas con 100 μ L de la solución activadora y por centrifugación por 30 s a 10,000 rpm, el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, se agregaron 300 μ L de isopropanol a los tubos con muestra y se

mezclaron como se ha descrito anteriormente. Dicha mezcla, fue colocada en la columna activada y se centrifugó por 30 s a 10,000 rpm, el sobrenadante fue descartado. Enseguida se agregaron 700 μ L del buffer primario de lavado a la columna, se centrifugó por 30 s a 10,000 rpm, el sobrenadante fue descartado. Después se agregaron 700 μ L del buffer secundario de lavado a la columna, se centrifugó por 30 s a 10,000 rpm, el sobrenadante fue descartado. Por último, se realizó una centrifugación de los tubos con las tapas abiertas durante 2 min a 10,000 rpm. La eliminación total de los residuos de los solventes utilizados se llevó a cabo colocando los tubos en una campana de flujo laminar durante 10-15 min. En seguida las columnas se colocaron en tubos nuevos y estériles (libre de DNAsa y RNAsa), se les agregaron 70 μ L del Buffer de elusión, se dejaron reposar por 1 min y se centrifugaron durante 1 min a 10,000 rpm para recuperar el RNA de la columna. Este fue dividido en 3 alícuotas de diferentes volúmenes (20, 20 y 30 μ L). Los RNAs obtenidos fueron tratados con el Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega); el cual consiste en 8 μ L de la muestra de RNA, 1 μ L de RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer, 1 μ L de RQ1 RNase-Free DNase; esta mezcla se mantuvo a 37°C por 30 min. En seguida se agregó 1 μ L de RQ1 DNase Stop Solution para terminar la reacción. Se incubó la muestra a 65°C por 10 min. Las muestras se llevaron a 4°C con ayuda del termociclador y enseguida se congelaron a -80°C para su posterior retrotranscripción. Una parte de la muestra fue analizada por el equipo nanodrop (Nanodrop 2000, Spectrophotometer).

Para obtener el cDNA se preparó un “*master mix*” que contenía; 4 μ L de GoScript™ Reaction Buffer (Promega), 1.5 μ L de MgCl₂, 1 μ L PCR Nucleotide Mix, 0.5 μ L de Recombinant RNasin, 1 μ L de GoScript™ Reverse Transcriptase y 7 μ L de agua libre de nucleasas. En seguida se agregaron 5 μ L de una mezcla que contenía 4 μ L del RNA previamente obtenido y 1 μ L de oligo dT; la mezcla fue calentada a 70 °C por 5 min en un termoblock (Multi-Blok®, LAB-LINE) e inmediatamente fueron llevados a hielo por 5 min, en seguida se centrifugaron por 1 min a 10,000 rpm. Para posteriormente ser colocados en un termociclador, programado con las siguientes condiciones: 25°C por 5min (alineación), 42 °C por 2 h (extensión) y 70°C por 15 min para inactivar la retrotranscriptasa.

Los cDNAs de todas las muestras fueron analizados con el equipo nanodrop (Nanodrop 2000, Spectrophotometer) para obtener su grado de pureza y concentración; enseguida fueron almacenadas a -80°C.

Finalmente para llevar a cabo la qPCR se utilizaron las condiciones de PCR convencional previamente descrita y se preparó un master mix de reacción que contenía; 5 µL de SYBR Green, 1 µL de los cDNAs (1:5), 1 µL primer Reverse (1:20), 1 µL primer Forward (1:20) y 2 µL de agua libre de nucleasas para dar un volumen final de 10 µL por reacción, Los master mix preparados fueron colocados en placas MicroAmp Fast Optical 48-Well Reactions Plate y sellados con MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film. Las características de amplificación fueron; etapa de mantenimiento (1 ciclo) 2 min a 50 °C y 5 min 95 °C, etapa de ciclos (40 ciclos) 30 s a 95°C y 40 s a 59°C; para la curva melt, 15 s a 95 °C, 1 min a 60°C y 15 s a 95°C (+0.05°C las lecturas). Todo esto se llevó a cabo en un equipo StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

6.19 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Le evaluación del efecto del extracto seleccionado sobre la formación de la biopelícula de *A. baumannii* se llevó a cabo mediante MEB. Para lo cual se utilizaron placas de fondo plano de 24 pozos, donde se llevó a cabo la interacción de *A. baumannii* con el extracto, utilizando las concentraciones sub-letales de la CMB. Después de 48 h de incubación, el medio de cultivo y las células planctónicas fueron retiradas con ayuda de una micropipeta, posteriormente los pozos fueron lavados con medio de cultivo MH estéril (2X). En seguida, la placa fue colocada cerca de un mechero Fisher durante aproximadamente 20 min, para acelerar la evaporación del medio de cultivo.

Una vez que los pozos estuvieran completamente secos, se agregar glutaraldehído al 1.5% para fijar la biopelícula, después de 4 h, el glutaraldehído fue retirado y los pozos fueron lavados con PBS 1X en 3 ocasiones para remover el fijador (la ausencia del olor característico es indicativo de que el fijador ha sido removido en su totalidad). Enseguida se procedió a la deshidratación de la muestra; la cual se consigue agregando secuencialmente diferentes concentraciones de etanol, comenzando con

etanol al 70%, seguido del 80%, después 90% y por último 96%, permitiendo el contacto de los tratamientos por un periodo de 30 min en cada uno de los alcoholes. Finalmente se agregó etanol absoluto por 30 min en 2 ocasiones.

Para llevar a cabo una deshidratación total de las muestras, fueron llevadas a la cámara del aparato de punto crítico a una presión de 900 psi en dónde se intercambié el etanol por CO₂ líquido. Posteriormente se aplicó calor a la cámara del aparato. El punto crítico de dicho aparato se alcanzó a una temperatura de 31.1°C y una presión de 1072 psi durante 4 min. La solución cambio de estado líquido a gaseoso. Finalmente se liberó el gas gradualmente de la cámara al despresurizar por 12 min. La muestra se obtuvo completamente seca y lista para el montaje.

Para el montaje de las muestras se utilizó un estereoscopio para visualizar las zonas a retirar con la ayuda de un bisturí estéril para colocarlas sobre la cinta de grafito que se encontraba adherida a un cilindro de aluminio de 1 cm x 1 cm. Ya montada la muestra en el cilindro, se colocó en el porta muestras del bañador de oro (Denton Vacuum). La introducción de flujo de corriente a un tiempo estimado (130 s) hace que se desprendan partículas de oro del disco y se depositen en la muestra, proporcionando un espesor de 100 Å.

La muestra se introdujo en la cámara del Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900LV) para ser observada bajo condiciones óptimas de 15 Kv (voltaje) de aceleración, distancia de trabajo fue de 10 mm a diferentes magnificaciones y escalas.

6.20 Citotoxicidad en línea celular normal PBMC.

La citotoxicidad del extracto seleccionado fue evaluada con células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) para ello, se tomó sangre de individuos sanos en seguida el volumen total (aproximadamente 10 mL) fue transferido a un tubo cónico de 50 mL. Posteriormente se agregó el mismo volumen de PBS estéril para tener una dilución 1:1. Por otro lado en tubo cónico de 50 mL se añadió la misma cantidad de Ficoll (10 mL). Luego, la sangre diluida fue agregada al Ficoll por las paredes del tubo en forma de Zigzag para crear un gradiente

(evitando que se mezclaran). Se observaron dos fases en el tubo cónico (volumen aproximado 30 mL), el cual, fue centrifugado a 1600 rpm durante 30 min a 25 °C. Transcurrido el tiempo, en el tubo se observaron 4 fases, la fase turbia fue separada a un tubo cónico de 50 mL. En seguida, el volumen fue diluido a 45 mL; de los cuales, se tomaron 20 µL que se mezclaron con 20 µL de azul tripan para hacer un conteo de células en una cámara de Neubauer. Al conocer el número de células, el tubo fue centrifugado a las condiciones anteriormente descritas para obtener un pellet de células. El pellet fue resuspendido en 5 mL de Medio RPMI; en seguida se prepararon las diluciones correspondientes para así agregar a cada pozo de la microplaca 200,000 células en cada 200 µL. Las concentraciones evaluadas del extracto seleccionado fueron 100, 250 y 500 ppm. Como control negativo se utilizó SDS al 10% en HCl 0.1 N y como control positivo fue utilizado medio RPMI. La microplaca fue incubada 24 h a 37 °C en atmósfera modificada (5% de CO₂). Después del tiempo de incubación la microplaca fue centrifugada a 3500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y el sobrenadante fue retirado con ayuda de una micropipeta (pozo por pozo). Las células adheridas a la microplaca fueron resuspendidas con 100 µL de medio RPMI y se les adicionó 20 µL del reactivo de MTT (5 mg de MTT con 1 mL de PBS). Seguido a esto se incubó la microplaca durante 2 h a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó nuevamente la microplaca a 3500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue retirado con ayuda de una micropipeta (pozo por pozo), lográndose observar los cristales de formazan. Dichos cristales fueron resuspendidos con 100 µL de DMSO con la ayuda de agitación suave para disolverlos. La microplaca se leyó a una DO de 570 nm (Nigjeh *et al.*, 2013). El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control positivo}} \times 100$$

6.21 Inhibición de la enzima α -glucosidasa.

En este caso, la enzima α -glucosidasa, el p-nitrofenil α D-glucopiranosido (pNPG) y el extracto se prepararon en PBS 100 mM, pH 6.9, en seguida se colocaron 25 µL de una suspensión enzimática (0.1 U/mL) y se mezclaron con 25 µL de diferentes

diluciones del extracto partiendo de 2500 ppm, la reacción fue incubada por 10 min a 37 ± 0.5 °C; posteriormente se adicionaron 50 μ L de la suspensión de pNPG (2 mM) y se procedió a incubar nuevamente por 37 ± 0.5 °C, se interrumpió la reacción agregando 50 μ L de carbonato de sodio 0.2 M. Finalmente se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm con ayuda de un lector de microplacas (Epoch) y se determinó el % de inhibición con la ecuación que se muestra más adelante (Majouli *et al.*, 2015; Dehghan *et al.*, 2016). Como control positivo se utilizó una solución de acarbosa a concentraciones de 62.5 a 1000 ppm y como control negativo tan sólo fue utilizado PBS.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} \times 100$$

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición con respecto al control negativo, fue obtenida la IC_{50} con el método Probit.

6.22 Actividad antiurolítica.

El ensayo de actividad antiurolítica se llevó a cabo como menciona Pérez *et al.*, (2015), con algunas modificaciones; se prepararon 50 mL de $CaCl_2$ (cloruro de calcio, Sigma Aldrich) 5 mM y de $Na_2C_2O_4$ (oxalato de sodio, Sigma Aldrich) 7.5 mM, con una solución de NaCl (cloruro de sodio, Sigma Aldrich) 0.15 M. Seguido a esto, ambas soluciones fueron filtradas usando membranas milipore de 0.22 μ m. Los ensayos se llevaron a cabo en tubos de ensaye de 12x75 mm, a los cuales se les agregaron 1450 μ L de $CaCl_2$, mas 100 μ L de la concentración de extracto a evaluar, los tubos fueron colocados en un baño maría a 37 ± 0.5 °C, donde con la ayuda de barras magnéticas de 7X2 mm (BelAir) se agitaron a 1000 rpm durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó la primer lectura de los tubos a una DO de 620 nm, después de esto se agregaron 1450 μ L de la solución de $Na_2C_2O_4$, para continuar lo la agitación durante 10 min. Después de este tiempo se obtuvo la lectura final de la reacción a 620 nm. Como control negativo sólo fueron usadas las soluciones de $CaCl_2$ y $Na_2C_2O_4$ para asegurar la formación de cristales. En el control positivo se utilizó citrato de potasio ($C_6H_5K_3O_7$) en

concentraciones de 1000 a 5000 ppm. El porcentaje de inhibición en la nucleación se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de nucleación} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs final de la muestra}}{\text{Abs final del control negativo}} \right) \right] \times 100$$

6.23 Aislamiento e identificación de compuestos activos

6.23.1 Pruebas químicas realizadas a los extractos seleccionados

Se realizó una evaluación química de los extractos seleccionados que presentaron actividad antimicrobiana, para detectar la posible presencia de diversas familias de metabolitos secundarios. Se procedió según las metodologías descritas por Domínguez (1973) y Marcano & Hasegawa (2002), empleándose ciertas técnicas y reactivos como: permanganato de potasio para dobles enlaces, hidróxido de sodio para cumarinas, bicarbonato de sodio para grupo carboxilo, cloruro férrico para oxhidrilos fenólicos (taninos), Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos, prueba de la espuma para saponinas, Shinoda para flavonoides, antrona para carbohidratos, Dragendorff (modificado) para alcaloides, Baljet para sesquiterpenlactonas y ácido sulfúrico para quinonas.

6.23.2 Cromatografía en columna.

Los extractos que presentaron mayor actividad biológica de acuerdo con los ensayos biológicos realizados, fueron sometidos a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna (CC), se utilizó Silica Gel grado técnico (Ca ~0.1%) 60Å de 200-400 mallas (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Dicha silica fue lavada con metanol, filtrada y llevada hasta sequedad, después fue activada en una estufa a 100° C por 2 h. La silica activada se utilizó para empacar una columna de 3.5 cm de diámetro y una altura de 40 cm. Los extractos activos fueron eluidos utilizando 2 L de diferentes combinaciones de cloroformo (CHCl₃) y metanol (MeOH); de un gradiente 10:0 hasta llegar a metanol solamente, cambiando los gradientes de 0.5 en 0.5 de polaridad. Se

empleó una lámpara UV con longitud de onda fija ($\lambda=365$ nm en oscuridad) para coleccionar el solvente eluido por bandas de color (Hernández, 2015).

Todas las fracciones obtenidas fueron concentradas en un rotavapor (Yamato BM 100), utilizando la metodología anteriormente descrita. Una vez concentradas, las fracciones secas se resuspendieron en no más de 10 mL del solvente apropiado y fueron colocadas en vasos de precipitado de 30 mL. A estas fracciones se les evaluó la pureza y similitud mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando cromatofolios de aluminio con Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt Germany), con la finalidad de mezclar las fracciones que mostraron un alto grado de similitud, superior al 95% (Ibarra *et al.*, 2011). Las fracciones con actividad antimicrobiana fueron seleccionadas mediante la técnica de difusión del pozo en agar la cual fue previamente descrita.

6.23.3 Bioautografía.

Los fracciones que presentaron actividad antimicrobiana fueron ensayadas con la técnica de bioautografía (Choma & Grzelak, 2011); en la cual fue colocado una capa agar MH sobre una TLC previamente eluida, posteriormente, se sembró la bacteria en la superficie del agar, y finalmente incubar la placa sembrada, en un cámara húmeda a 37 °C por 24 h. La presencia de una banda de inhibición nos permitió identificar la posición de el o los compuesto (s) responsables de la actividad antimicrobiana, el/los R_f's de cada cromatografía fueron registrados para utilizarlos en ensayos posteriores de purificación.

6.23.4 Cromatografía en columna para las fracciones activas.

Después de haber seleccionado las fracciones con actividad antimicrobiana con la técnica antes mencionada, se procedió a separar nuevamente dichas fracciones con la ayuda de una columna de 1 cm de diámetro por 45 cm de alto, eluyendo la columna con 250 mL de la fase móvil correspondiente para cada fracción activa, coleccionando fracciones de entre 3 a 4.5 mL. Las fracciones obtenidas fueron comparadas por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando cromatofolios de aluminio con Silica Gel

60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt Germany), con la finalidad de separar las fracciones que contenían la banda o región con actividad.

6.23.5 Pruebas químicas y reveladores específicos para las sub-fracciones.

Se realizaron pruebas químicas para aquellas sub-fracciones que contenían las bandas activas, para conocer el tipo de metabolito contenidos en estas; seguido a esto y al tener referencia de los metabolitos presentes se seleccionaron reveladores específicos para las eluciones obtenidas en las autobiografías y así poder identificar de manera parcial a los compuestos responsables (Hernández, 2015; Wagner & Bladt, 2003).

6.23.6 Cromatografía en capa fina preparativa (PTLC).

Las sub-fracciones activas fueron purificadas mediante cromatografía en capa preparativa (PLC), utilizando Silica Gel Tipo G de 5-15 µm (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Para esto 25 g de silica fueron resuspendidos en 50 mL de dH₂O, la suspensión resultante se colocó en placas de vidrio de 20X20 cm, previamente lavadas y desengrasadas, dichas placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche, para eliminar el exceso de humedad, las placas fueron activadas en una estufa a 80°C durante 1h. Las sub-fracciones se colocaron en la parte inferior de las placas aproximadamente a 1.5 cm del borde, con la ayuda de una micropipeta, aplicando puntos consecutivos de 7 µl para formar una línea continua a lo ancho de la placa. Este proceso se repitió al menos 5 veces. Las placas fueron eluidas utilizando como fase móvil los solventes apropiados anteriormente determinados. Las placas fueron retiradas del sistema cuando la fase móvil se encontraba aproximadamente a 1.5 cm del borde superior de la placa, una vez retiradas se realizaron observaciones bajo luz UV para observar con mayor claridad la separación de las bandas (Hernández, 2015).

Las bandas responsables de la actividad fueron raspadas de acuerdo con los R_f's obtenidos en la autobiografía (Gutiérrez et al., 2009) y recuperadas en el solvente de extracción primaria utilizado (metanol). Esto se realizó colocando la silica que contenía

las bandas, dentro en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, se añadió el metanol hasta que cubriera la muestra, se dejó la extracción toda la noche sin agitación, para después con el sobrenadante (donde se contenían las bandas recuperadas), ser centrifugado por 1 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente para eliminar los restos de silica al decantar la muestra, por otro lado; el sobrenadante podía ser filtrado usando membranas de nylon de 0.22 μm para eliminar los restos de silica. Este procedimiento se llevó al menos por 3 ocasiones. Ya recuperadas las bandas fueron colocados en viales ambar y llevados hasta sequedad para sus posteriores análisis espectroscópicos.

6.23.7 Espectroscopia de Infrarojos con Transformación de Fourier (FT-IR) y pruebas químicas a las bandas activas.

Las bandas ya secas fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojos en un equipo Pelkin-Elmer, utilizando 2 mg de cada banda. Los resultados fueron analizados, y de acuerdo con los grupos funcionales observados en las muestras, se llevaron a cabo nuevamente pruebas químicas para confirmar al tipo de metabolito secundario al que pertenecían.

6.23.8 Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a masas (HPLC-MS) y caracterización del o los compuestos.

Para conocer la pureza e identificar las bandas activas obtenidas, se llevó a cabo una Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS), para esto; se utilizó un Cromatógrafo de ultra alta resolución (UHPLC) Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex) equipado con bomba cuaternaria, desgasificador en línea, automuestreador, horno de columna y detector UV-Vis de longitud de onda fija acoplado a un espectrómetro de masas LCQ Fleet (Thermo Scientific) equipado con fuente de ionización de electrospray y analizador de trampa de iones. Se realizaron pruebas a diferentes longitudes de onda, igualmente con diferentes concentraciones de solventes, para obtener el mejor resultado dependiendo de la banda activa que haya sido

purificada. Antes del análisis las muestras fueron filtradas con membrana de nylon de 0.2 μm (Millipore). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Al obtener los cromatogramas, las masas moleculares y fragmentaciones de los de bandas analizadas, se procedió a interpretar e identificar con los resultados obtenidos a los metabolitos biológicamente activos contenidos en los extractos.

6.24 Diseño experimental

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, al menos en tres repeticiones. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 23.0 (SPSS Inc., Chicago IL). Los resultados se analizaron mediante la prueba de Varianza, comparación múltiple de medias (ANOVA), prueba de Tukey y análisis PROBIT (cuando fuera necesario) con un valor de significancia $P \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Material vegetal.

El material vegetal utilizado fue colectado entre los meses de abril y mayo del año 2015. Un espécimen de cada especie fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para su identificación de ambas especies por parte de los Doctores Jorge Armando Verduzco Martínez y Marco Antonio Guzmán Lucio; así mismo el Biol. Julio Martínez Ramírez, perteneciente al departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, colaboró con la identificación de la especie *Nothoscordum bivalve*.

7.2 Tinción de gram a la cepa utilizada.

Se llevó a cabo una tinción de Gram para corroborar la morfología microscópica de la cepa otorgada por el Hospital Universitario. Al observar al aumento de 100X se encontraron cocobacilos pequeños gram negativos, característicos del género *Acinetobacter* (Figura 1).

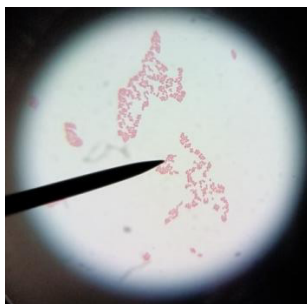


Figura 1. Observación microscópica a 100X con tinción de Gram de la cepa utilizada.

7.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se resumen en la Tabla 4. De las cuales destacan las pruebas de hemólisis en agar sangre y de TSI, ambas negativas siendo y aerobiosis estricta son características del género *Acinetobacter*.

Tabla 4. Resultados de las diversas pruebas bioquímicas para la cepa en estudio.

Prueba	Resultado
Bioquímica	
Catalasa	Positivo (Producción de gas al aplicar el H ₂ O ₂)
Oxidasa	Negativo
MIO	Movilidad negativa, descarboxilación de la ornitina positiva e indol negativo
Citrato de Simmons	Positivo (Cambio del medio a color azul)
TSI	K/K No fermentador de azúcares, no producción de ácido sulfhídrico, no producción de gas (crecimiento aerobio)
SIM	Movilidad negativa, no producción de ácido sulfhídrico e indol negativo
LIA	K/K Descarboxilación de la Lisina positivo, no producción de ácido sulfhídrico (crecimiento aerobio)
Hemólisis	Negativo



Figura 2. Resultados de las pruebas bioquímicas; TSI, MIO, SIM, LIA y citrato de Simmons de izquierda a derecha.



Figura 3. Resultado negativo de hemólisis en agar sangre.

7.4 Evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos de la cepa utilizada.

La cepa de *A. baumannii* fue sometida a pruebas de susceptibilidad con diversos antibióticos, siendo un total de 14 de ellos; divididos en 2 multidiscos para gram negativos. Los resultados se observan en la Tabla 5 y Tabla 6.

Tabla 5. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de *A. baumannii* (multidisco Marca BioRad).

Antibiótico	Concentración (µg)	Resultado
Amikacina	30	Resistente
Ampicilina	10	Resistente
Cefalotina	30	Resistente
Cefepime	30	Resistente
Cefotaxima	30	Resistente
Ceftriaxona	30	Resistente
Cloranfenicol	30	Resistente
Gentamicina	10	Resistente
Netilmicina	30	Resistente
Nitrofurantoína	30	Resistente
Levofloxacin	5	Sensible
Trimetoprima/sulfametoxazol	25	Resistente

Tabla 6. Susceptibilidad a diferentes antibióticos en contra de *A. baumannii* (multidisco Marca Multibac-ID).

Antibiótico	Concentración	Resultado
Amikacina	30 µg	Resistente
Ampicilina	10 µg	Resistente
Carbencilina	100 µg	Resistente
Cefalotina	30 µg	Resistente
Cefotaxima	30 µg	Resistente
Cloranfenicol	30 µg	Sensible
Gentamicina	10 µg	Resistente
Netilmicina	30 µg	Resistente
Norfloxacin	10 µg	Resistente
Trimetoprima/sulfametoxazol	25 µg	Sensible

Se presentó un alto grado de resistencia en ambos antibiogramas. Para el caso del cloranfenicol y la trimetoprima/sulfametoxazol un resultado variable entre ambas evaluaciones. Finalmente, para la levofloxacin presentó sensibilidad.

7.5 Extracciones en reflujo tipo Soxhlet / maceración sucesiva y el rendimiento obtenido de los extractos.

Para *P. incanum* y *N. bivalve* se utilizaron diferentes cantidades de material vegetal, así como diferentes cantidades de solventes para llevar a cabo cada una de las diferentes extracciones. Dichas cantidades se muestran a continuación, de igual manera del rendimiento obtenido de cada uno de ellos (Tabla 7). Los extractos metanólicos son aquellos que presentaron mayor rendimiento.

Tabla 7. Condiciones y rendimiento de las extracciones de *P. incanum* y *N. bivalve*.

Planta	Tipo de extracción	Tipo de solvente	Rendimiento
<i>P. incanum</i>	soxhlet	Hexano	2.54 %
<i>P. incanum</i>	soxhlet	Cloroformo	2.51%
<i>P. incanum</i>	soxhlet	Metanol	8.05 %
<i>P. incanum</i>	maceración	Metanol	14.49 %
<i>N. bivalve</i>	soxhlet	Hexano	2.33 %
<i>N. bivalve</i>	soxhlet	Cloroformo	1.57 %
<i>N. bivalve</i>	soxhlet	Metanol	21.79 %
<i>N. bivalve</i>	maceración	Metanol	28.5%

7.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Los extractos que obtuvieron mayor rendimiento de extracción (metanólicos) mostraron mayor actividad antimicrobiana en contra de la cepa en estudio. Los resultados se observan en la Tabla 8, donde los extractos metanólicos muestran la mencionada actividad.

Tabla 8. Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Extracto	Inhibición (radio en cm)
	<i>A. baumannii</i>
<i>P. incanum</i> Soxhlet Hexano	0.52±0.24*
<i>P. incanum</i> Soxhlet Cloroformo	NI**
<i>P. incanum</i> Soxhlet Metanol	0.94±0.08
<i>P. incanum</i> Maceración Metanol	1.32±0.06
<i>N. bivalve</i> Soxhlet Hexano	NI
<i>N. bivalve</i> Soxhlet Cloroformo	0.65±0.16
<i>N. bivalve</i> Soxhlet Metanol	1.48±0.03
<i>N. bivalve</i> Maceración Metanol	1.65±0.05

*Desviación estándar, **NI: No Inhibición

7.7 Obtención de la concentración mínima bactericida.

Los extractos metanólicos de mayor actividad, se les determinó su CMB, sobre *A. baumannii*; los resultados se muestran en la Tabla 9. La Figura 4 y 5 muestran parte de los resultados obtenidos para el extracto de *N. bivalve* maceración MeOH.

Tabla 9. Concentraciones mínimas bactericidas de los extractos seleccionados.

Extracto	Concentración (mg/mL)
<i>P. incanum</i> Maceración MeOH	8.16±0.40*
<i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH	8.50±0.54
<i>N. bivalve</i> Maceración MeOH	8.33±0.51
<i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH	7.50±0.54

*Desviación estándar (n=6)

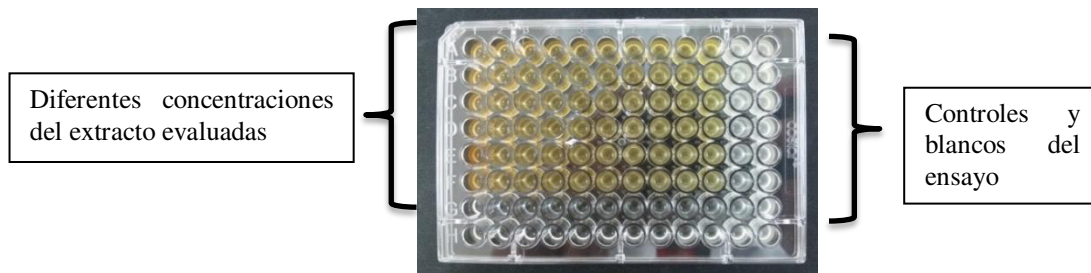


Figura 4. Técnica de microdilución para el extracto de *N. bivalve* Maceración MeOH para obtener su CMB.



Figura 5. Crecimiento de bacteriano por técnica de goteo del extracto de *N. bivalve* Maceración MeOH.

7.8 Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*.

Los resultados de la toxicidad de los extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* se resume en las Tabla 10. Además de terminó la cantidad de solvente tolerable de los crustáceos siendo la siguiente; agua destilada 4.5%, metanol 3% y etanol 1%. El control positivo de KMnO_4 a 100 y 300 ppm registró el 100% de mortalidad. Además, importante es el hecho de que <5% de la población de artemias usadas, mueren sin recibir algún tratamiento (control negativo). En la Figura 7 puede apreciarse una de las repeticiones del ensayo para el extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH.

Tabla 10. Dosis letales 50 (DL₅₀) de los extractos activos y su respectiva toxicidad.

Extracto	DL ₅₀ en ppm	Toxicidad
<i>P. incanum</i> Maceración MeOH	380	Moderadamente tóxico
<i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH	1882	Relativamente inocuo
<i>N. bivalve</i> Maceración MeOH	916	Ligeramente tóxico
<i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH	1023	Prácticamente no tóxico

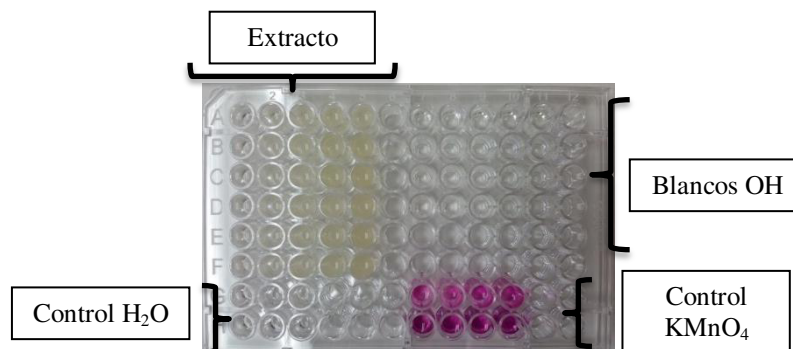


Figura 6. Evaluación tóxica del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH sobre *A. salina*.

7.9 Ensayo de hemólisis (citotoxicidad preliminar).

La capacidad hemolítica preliminar de los extractos se puede observar en la Figura 8. El extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH mostró menor efecto hemolítico y el mayor por *N. bivalve* (maceración MeOH).

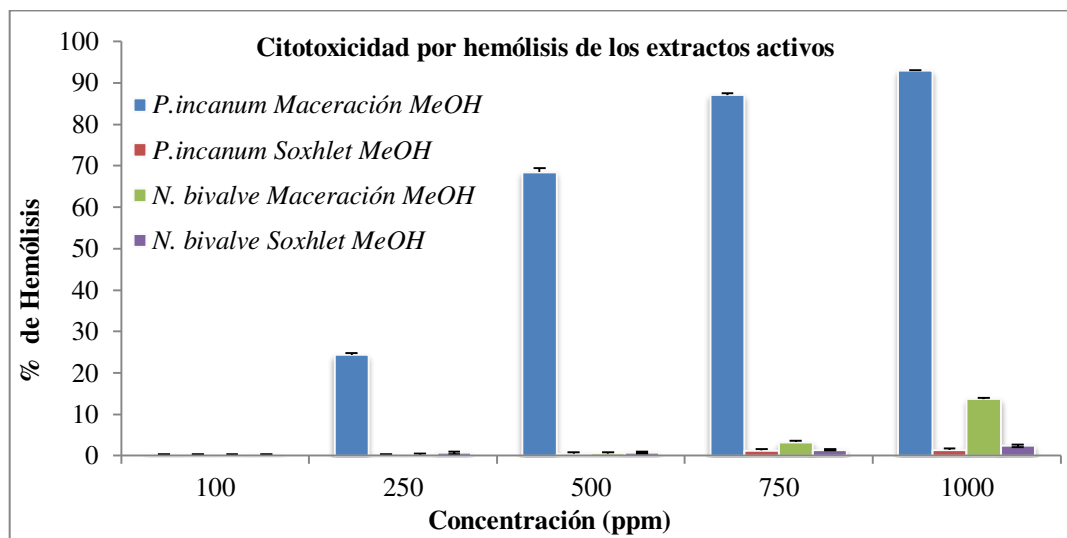


Figura 7. Resultado de la prueba preliminar de hemólisis en agar ICC suplementado con sangre;

1. *P. incanum* Maceración MeOH, 2. *P. incanum* Soxhlet MeOH, 3. *N. bivalve* Maceración MeOH y 4. *N. bivalve* Soxhlet MeOH.

Los resultados espectrofotométricos de citotoxicidad (hemólisis) de los extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* en la Gráfica 1. Puede observarse claramente que los

extractos provenientes de la extracción por maceración son mayormente hemolíticos, que aquellos que fueron obtenidos por la extracción tipo Soxhlet con extracciones sucesivas de solventes. Además de apreciar que el extracto de *N. bivalve* maceración MeOH no resultó ser el más hemolítico ya que el ensayo preliminar (Figura 7) así lo indicaba. Es por lo que el ensayo previo nos permite conocer cuales extractos poseen algún grado de hemólisis.



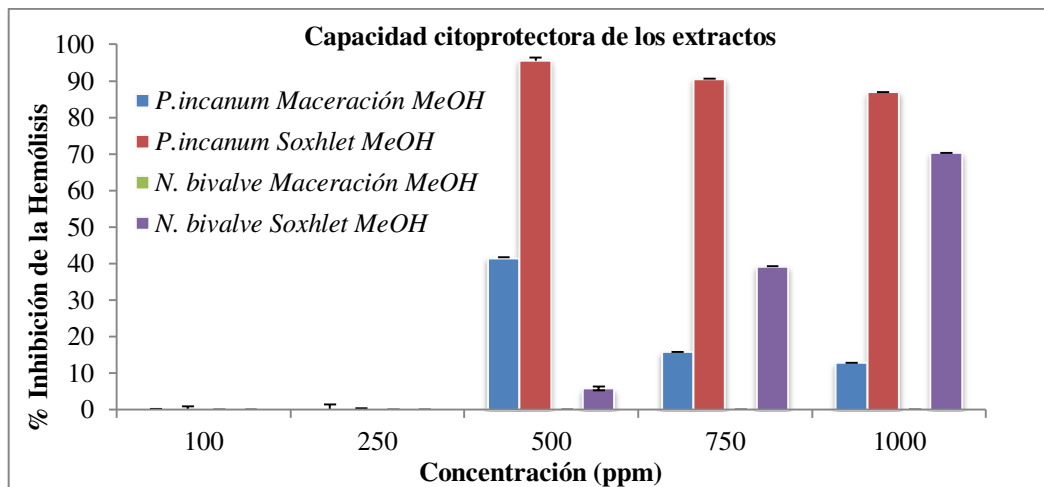
Gráfica 1. Porcentaje de hemólisis de los extractos activos en cada una de las concentraciones evaluadas.

7.10 Efecto citoprotector de los extractos utilizando el radical libre AAPH como causante de la hemólisis.

Para conocer la capacidad citoprotectora o antihemolítica de los extractos activos, se evaluaron las mismas concentraciones que en la hemólisis. Los resultados de los extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* se resume en la Gráfica 2.

Los extractos de la extracción por maceración presentan poca o nula citoprotección; para *P. incanum*, produce un 41.94% de citoprotección a 500 ppm, para *N. bivalve*, ninguna de las concentraciones evaluadas presentó citoprotección.

Para los extractos por Soxhlet; en el caso de *P. incanum* se produce una máxima citoprotección a partir de la concentración de 500 ppm (95% aprox) y para *N. bivalve*, la concentraciones de 500 a 1,000 ppm (79% aprox).



Grafica 2. Porcentaje de capacidad citoprotectora de los extractos activos en cada una de las concentraciones evaluadas.

En modificaciones realizadas a la técnica de capacidad citoprotectora con la utilización del agua destilada como control positivo (Figura 8). Puede observarse que los extractos de la extracción Soxhlet para ambas plantas presentan menor hemólisis (Gráfica 3). La hemólisis causada por el AAPH comparada con la del agua destilada fue del 45.28%.

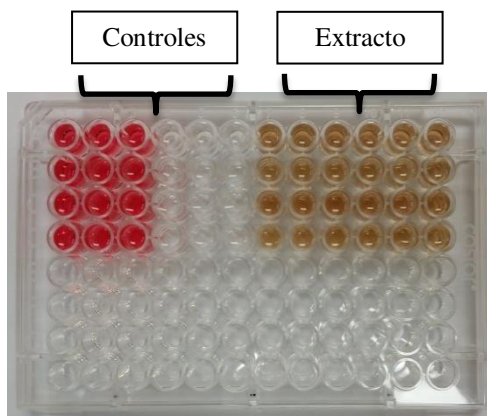
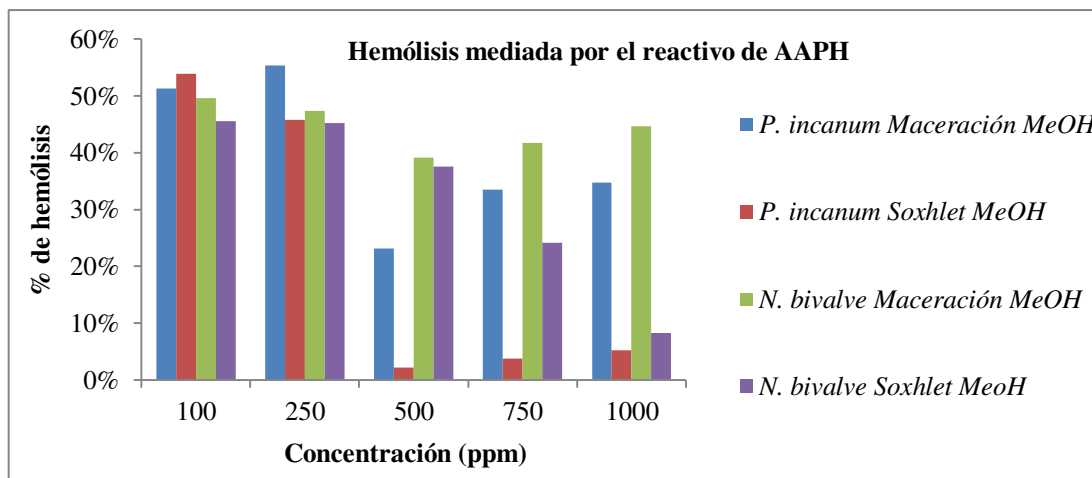
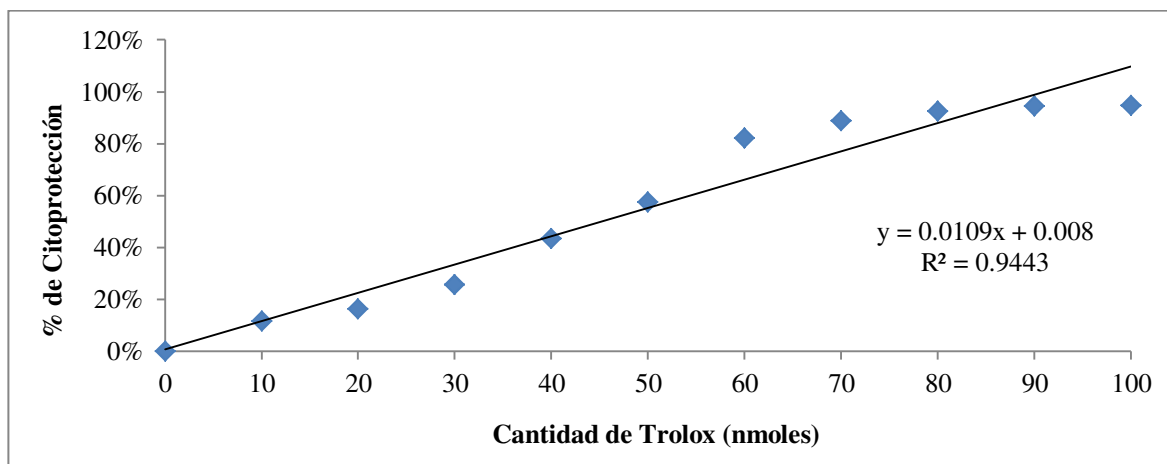


Figura 8. Evaluación de la capacidad hemolítica para el extracto de *N. bivalve* Maceración MeOH, utilizando el radical AAPH como causante de la hemólisis.



Gráfica 3. Porcentaje de hemólisis causada por el reactivo de AAPH y los extractos activos en cada una de las concentraciones evaluadas.

Dentro de las modificaciones realizadas a la técnica para evaluar la capacidad antioxidante, una cantidad del reactivo Trolox fue agregada a los tubos de reacción en cantidades de 0 a 100 nmoles. Así mismo se colocaron blancos de Trolox (metanol + PBS pero sin Trolox) para saber si causaba hemólisis encontrando que no causaron efecto. Los resultados se muestran en la Gráfica 4 y la Figura 9.



Gráfica 4. Curva de la interacción del radical AAPH con reactivo de Trolox (0 a 100 nmoles).

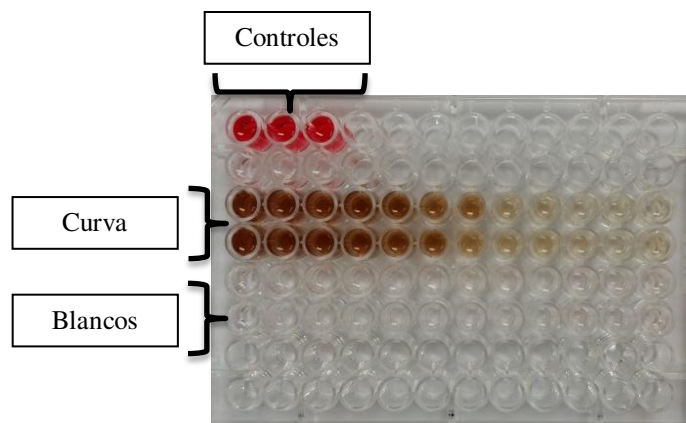
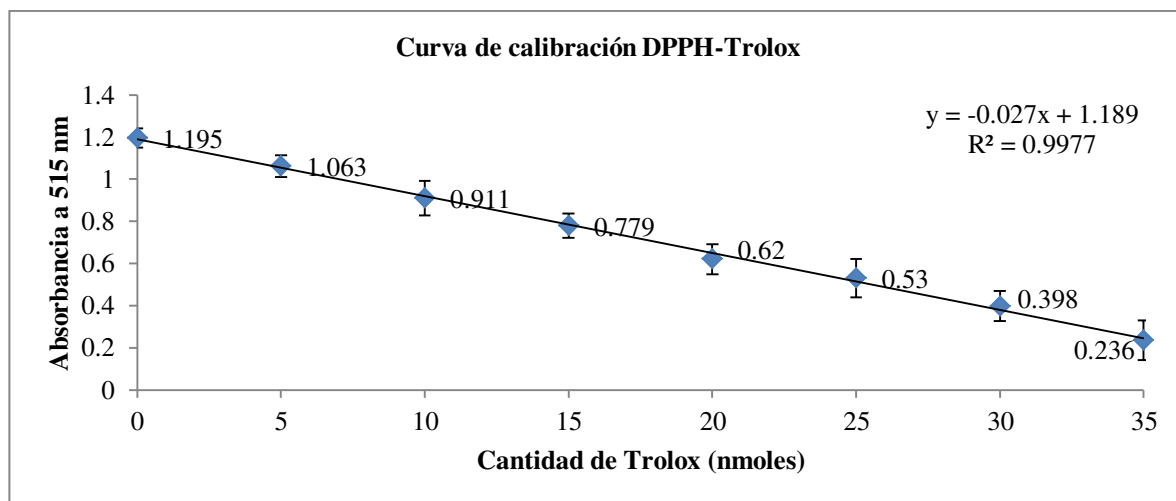


Figura 9. Curva de AAPH con reactivo de Trolox (0 a 100 nmoles).

7.11 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de DPPH.

Los resultados de la curva estándar DPPH-Trolox (0 a 35 nmol), para calcular la concentración de equivalentes de Trolox de cada uno de los extractos activos se muestran en la Gráfica 5. Mientras que, en la Tabla 11 se aprecian los resultados de la capacidad antioxidante, se observa que a pesar que los extractos fueron obtenidos con diferente método son similares.



Gráfica 5. Curva de DPPH con el reactivo de Trolox.

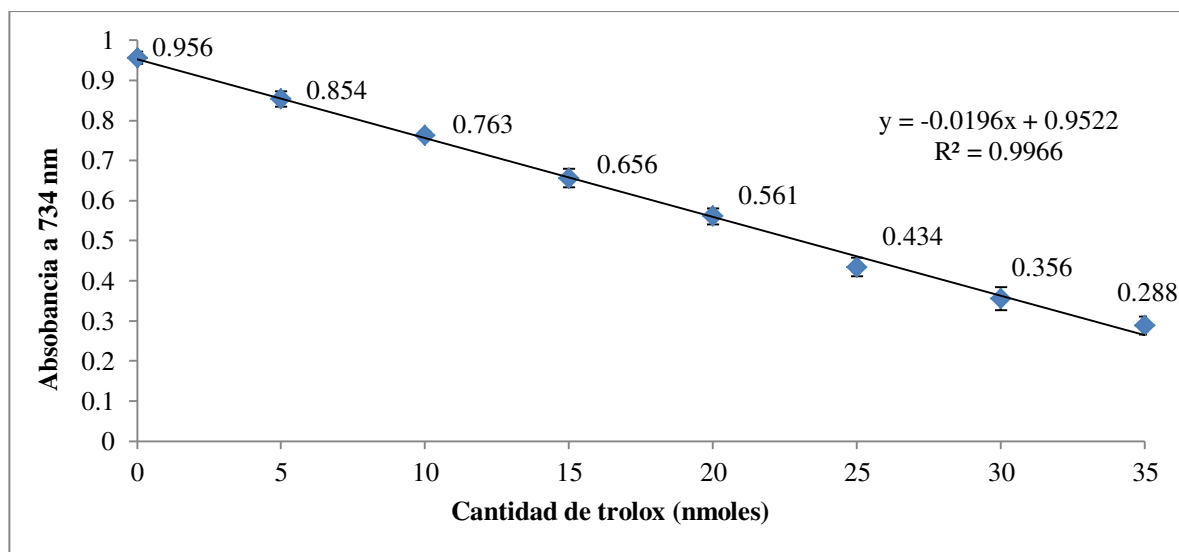
Tabla 11. Capacidad antioxidante de los extractos activos por la curva DPPH-Trolox.

Extracto	Capacidad antioxidante (μmol de equivalentes de Trolox / g de extracto seco)
<i>P. incanum</i> Maceración MeOH	433.33 \pm 11.43*
<i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH	459.11 \pm 22.55
<i>N. bivalve</i> Maceración MeOH	271.85 \pm 24.49
<i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH	275.55 \pm 21.05

*Desviación estándar.

7.12 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de ABTS.

En la Grafica 6 se muestra la curva ABTS-Trolox (0 a 35 nmol), para calcular la concentración equivalente de Trolox de cada uno de los extractos activos. Los resultados se resumen en la Tabla 12; se observa que los extractos obtenidos con diferentes métodos son similares. Los valores obtenidos son superiores a aquéllos calculados por medio del radical DPPH.



Gráfica 6. Curva de ABTS con el reactivo de Trolox.

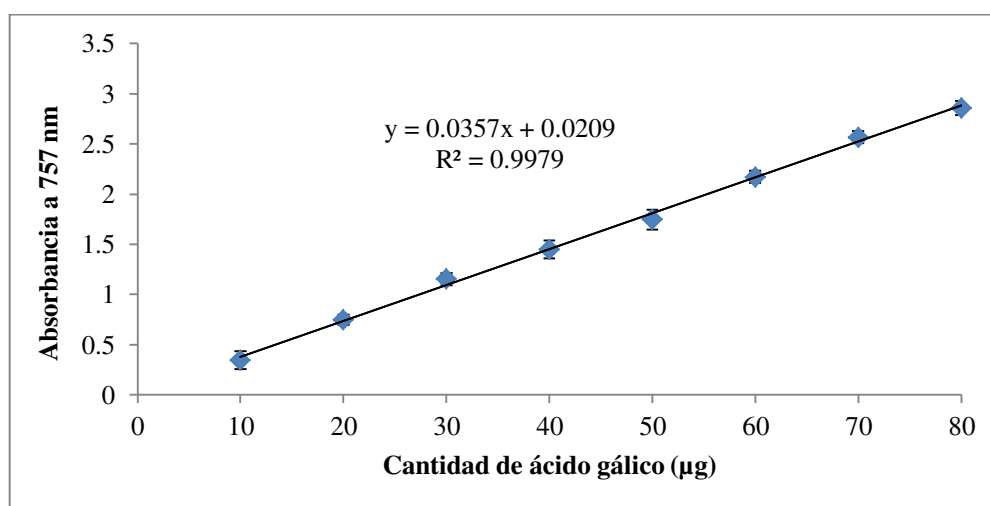
Tabla 12. Capacidad antioxidante de los extractos activos cuantificados por la curva ABTS-Trolox.

Extracto	Capacidad antioxidante (μmol de equivalentes de Trolox / g de extracto seco)
<i>P. incanum</i> Maceración MeOH	565.58 \pm 2.97*
<i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH	598.99 \pm 3.47
<i>N. bivalve</i> Maceración MeOH	337.64 \pm 1.65
<i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH	362.35 \pm 2.17

*Desviación estándar.

7.13 Cuantificación de fenoles solubles totales.

La curva para la cuantificación de Fenoles Solubles Totales se muestra en la Gráfica 7 y los resultados en la Tabla 13.



Gráfica 7. Curva de calibración para Fenoles Solubles Totales con ácido gálico (0 a 100 μg).

En la Tabla 13, se resumen los resultados obtenidos para la cuantificación de los fenoles solubles totales en cada muestra; puede observarse, que a diferencia de las técnicas de cuantificación de la capacidad antioxidante, con los reactivos DPPH y ABTS no existe correlación entre los extractos ya que los valores entre extractos de la misma especie no presentan valores semejantes.

Tabla 13. Cuantificación de los fenoles solubles totales para los extractos activos.

Extracto	Cantidad de equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de extracto seco.
<i>P. incanum</i> Maceración MeOH	1.348±0.07*
<i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH	4.133±0.04
<i>N. bivalve</i> Maceración MeOH	2.542±0.01
<i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH	3.119±0.02

*Desviación estándar.

7.14 Efecto de concentraciones sub-letales de la CMB sobre el crecimiento de *A. baumannii*, ensayo preliminar para la inhibición de biopelículas.

Se seleccionaron los extractos de las extracciones en Soxhlet de ambas plantas; ya que estos presentaron menor toxicidad y/o citotoxicidad En la Tabla 14 muestran los resultados de las concentraciones sub-letales.

Tabla 14. Concentraciones sub-letales sobre el crecimiento de *A. baumannii* de los extractos seleccionados.

Extracto	Concentración del 100 % CMB (mg/mL)	Concentración del 75% CMB (mg/mL)	Concentración del 50 % CMB (mg/mL)	Concentración del 25% CMB (mg/mL)
<i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH	8.50	6.37	4.25	2.12
<i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH	7.50	5.61	3.74	1.87

Los resultados obtenidos al evaluar las concentraciones sub-letales de los extractos sobre el crecimiento de *A. baumannii*; se muestran en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Efecto de las concentraciones sub-letales sobre el crecimiento de *A. baumannii* (UFC/mL) a las 24 h del ensayo.

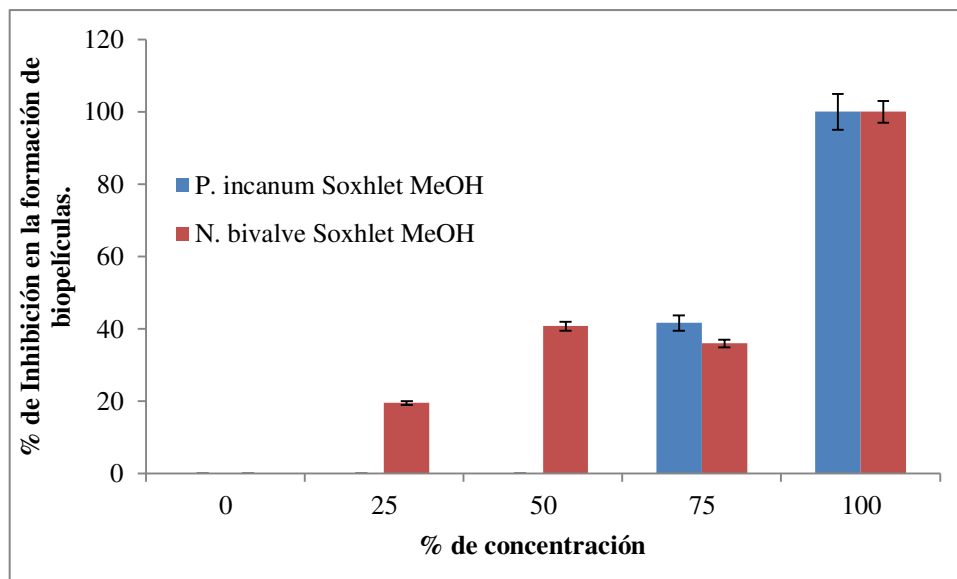
Extracto	Concentración del 100 % CMB	Concentración del 75% CMB	Concentración del 50 % CMB	Concentración del 25% CMB	Concentración del 0% CMB
<i>P. incanum</i> Soxhlet MeOH	0 UFC/mL	1.22x10 ⁹ UFC/mL	1.29 x10 ⁹ UFC/mL	2.22 x10 ⁹ UFC/mL	3.40 x10 ⁹ UFC/mL
<i>N. bivalve</i> Soxhlet MeOH	0 UFC/mL	3.25 x10 ⁹ UFC/mL	1.18 x10 ⁹ UFC/mL	1.58 x10 ⁹ UFC/mL	1.25 x10 ⁹ UFC/mL

Tabla 16. Efecto de la cantidad de solvente utilizado para cada tratamiento (blancos) sobre el crecimiento de *A. baumannii*.

Solvente	Concentración del 100 % CMB (mg/mL)	Concentración del 75% CMB (mg/mL)	Concentración del 50 % CMB (mg/mL)	Concentración del 25% CMB (mg/mL)
Metanol	3.23 x10 ⁹ UFC/mL	3.50 x10 ⁹ UFC/mL	2.73 x10 ⁹ UFC/mL	3.18 x10 ⁹ UFC/mL

7.15 Efecto de las concentraciones sub-letales de la CMB sobre la formación de biopelículas.

La Gráfica 8, muestran el efecto de las concentraciones sub-letales de las CMB's al inhibir la formación de biopelículas en *A. baumannii*. El extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH, muestra mayor capacidad de inhibición en las concentraciones del 25 y 50% de su CMB, con respecto al extracto de *P. incanum* Soxhlet MeOH (Figura 10). El extracto de *P. incanum* Soxhlet MeOH muestra mayor inhibición a la concentración del 75% de la CMB.



Gráfica 8. Inhibición de la formación de biopelículas por efecto de las concentraciones sub-letales de las CMB's de los extractos.

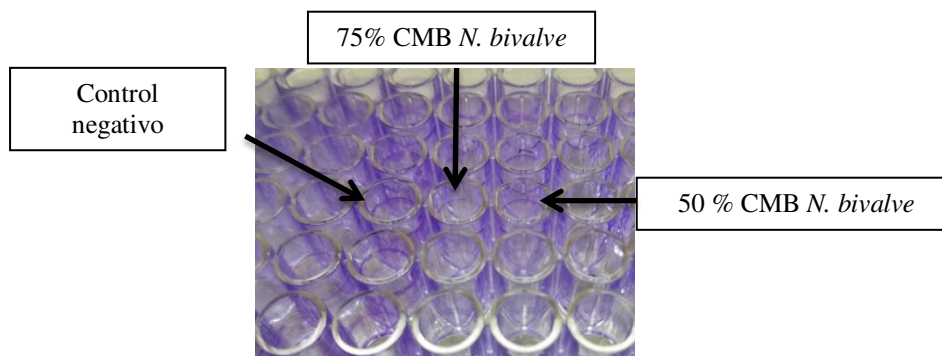


Figura 10. Efecto del extracto de *N. bivalve* (Soxhlet MEOH) en la formación de biopelículas antes de desteñir con Etanol al 95%.

7.16 Determinación del tiempo de Coagulación

Para los ensayos de TP y TTPa se seleccionaron los extractos provenientes del Soxhlet de ambas plantas, las concentraciones seleccionadas fueron de 500 y 1000, debido a que estas concentraciones no presentaron letalidad frente a *A. salina*, menor porcentaje de hemólisis y mayor citoprotección frente al reactivo de AAPH. Los resultados para ambos ensayos (TP y TTPa) se encuentran resumidos en la Tabla 17.

El control (plasma sin algún tratamiento) mostró un tiempo de TP de 12.26 ± 0.15 s y TTPa de: 32.63 ± 0.66 s (datos no mostrados), para saber si existía una diferencia significativa con respecto a los controles; se llevó a cabo el análisis estadístico para todos los datos, siendo el análisis de medias (ANOVA) de una vía para observar si existía diferencia entre ellas; el análisis mostró que al menos una media era diferente al resto. Para determinar cuál era diferente se llevó a cabo un análisis TUKEY para observar que medias no eran iguales entre sí. Para el caso de las pruebas en TP se encontró que los extractos de *P. incanum* en concentraciones de 500 y 1000 ppm mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos incluyendo el control. Por otro lado, en las pruebas de TTPa no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$).

Tabla 17. Resultados para los ensayos de TP y TPPa.

Extractos		
Ensayo	<i>Pi Sx MeOH</i> 500 ppm (s)	<i>Pi Sx MeOH</i> 1000 ppm (s)
TP	$13.06 \pm 0.15^*$	13.36 ± 0.11
TTPa	35.33 ± 1.51	35.96 ± 0.25
<i>Nb Sx MeOH</i> 500 ppm		
<i>Nb Sx MeOH</i> 1000 ppm		
TP	12.36 ± 0.15	12.36 ± 0.11
TTPa	33.86 ± 2.55	33.8 ± 1.83
Blanco MeOH 500 ppm		
Blanco MeOH 1000 ppm		
TP	12.1 ± 0.20	12.16 ± 0.11
TTPa	33.63 ± 0.35	33.36 ± 0.95

(* Desviación estándar n=3)

NOTA: Hasta este ensayo, con los resultados obtenidos se seleccionó el extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH para continuar con el resto de evaluaciones biológicas; esto debido a que no presentó alteraciones en los tiempos de coagulación, toxicidad y/o

citotoxicidad y una sostenida inhibición en la formación de biopelículas en *A. baumannii*.

7.17 Determinación del grado de expresión de los genes asociados a la adhesión celular y a la producción de biopelículas.

Al evaluar la pureza del DNA extraído de un cultivo de 18 h de crecimiento de *A. baumannii* con ayuda de un equipo nanodrop, se obtuvo una concentración >100 ng/ μ L y densidad óptica de aprox. 1.0. En seguida se llevó a cabo una corrida con un gel de agarosa para observar la calidad del DNA extraído (Figura 11).

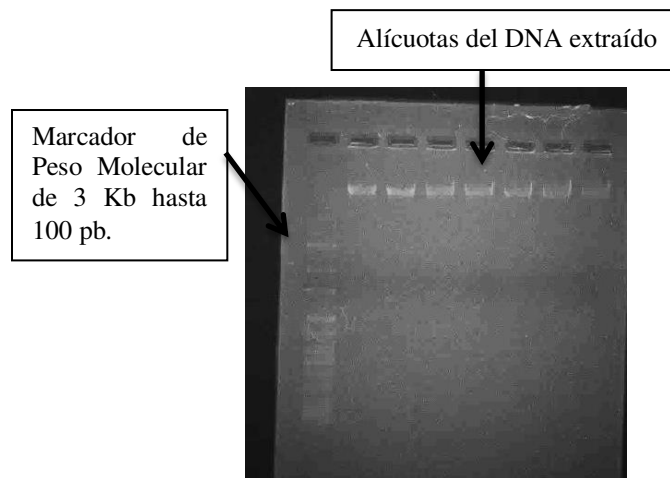


Figura 11. DNA obtenido por la extracción del kit comercial.

Para verificar la presencia de los genes *recA*, *bap*, *csuE* y *ompA*, se corrió un gel con las características descritas en la metodología y se observó la amplificación de los genes de virulencias así como el gen constitutivo (Figura 12).

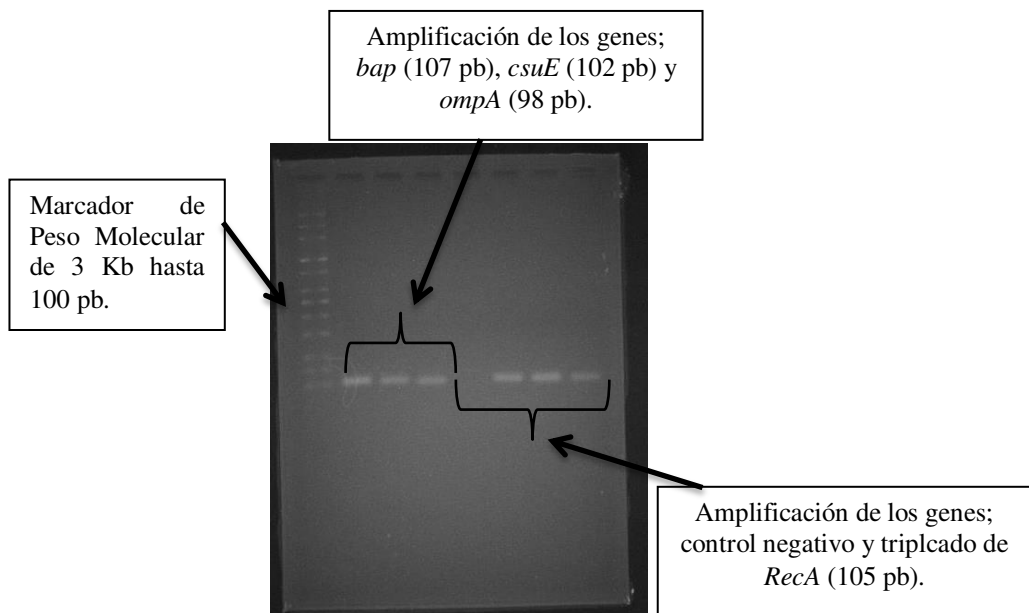


Figura 12. Amplificación de los genes de virulencia y el gen constitutivo.

Al corroborar la presencia de los genes de interés; se llevó a cabo la interacción de la bacteria con el extracto de *N. bivalve* para la extracción de RNA para esta ocasión los ensayos fueron llevados a cabo en tubos de ensayo de 16 x 100 mm a un volumen final de 5 mL. En este caso, se evaluaron las concentraciones sub-letales de la CMB del 25, 50, 60 y 75% (Figura 13), apreciándose inhibición en la formación de las biopelículas al 50, 60 y 75% de la CMB, con respecto a los tubos control y blancos.

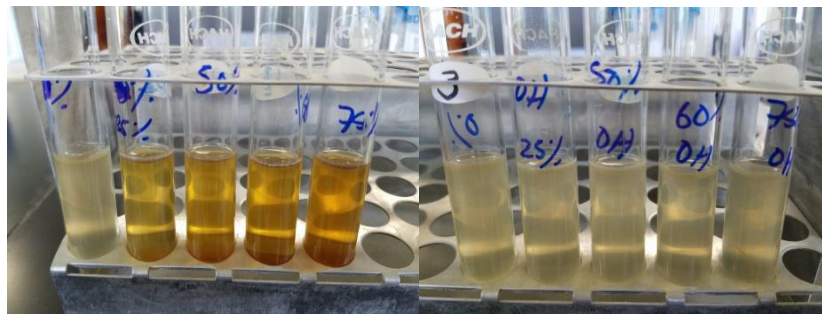


Figura 13. Concentraciones sub-letales del extracto activo de *N. bivalve* sobre *A. baumannii*, se muestran los tratamientos así como los blancos de solvente.

La extracción de RNA se llevó a cabo de los tubos de 0, 25, 50 y 75% así como de sus respectivos blancos de metanol; para ello se utilizó el Total RNA Purification kit (Jena Bioscience).

Al obtener los RNA's, una de las muestras fue analiza por gel de agarosa con las siguientes características: 1.5 X, buffer TAE 1X y 90 volts por 1 h, otra de ellas fue

utilizada para evaluar su pureza y concentración con el equipo nanodrop; obteniendo, pureza aprox. 2.0 (relación 260/230) y concentraciones entre 50 y 60 ng/μL. Y la muestra final fue utilizada para tratarla con DNAsa, ya que además de observarse las bandas del 23S y 16S del RNA, se observa contaminación de DNA genómico (Figura 14).

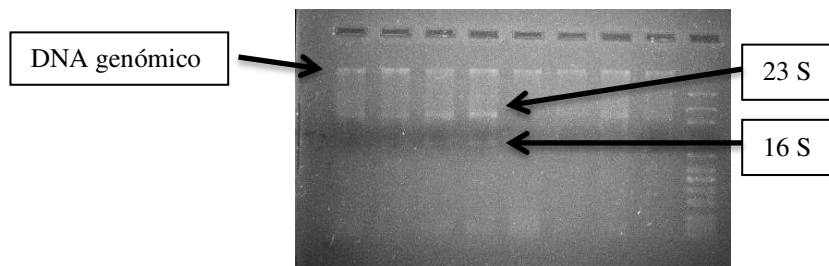


Figura 14. Separación de los RNA's obtenidos blancos tratamientos (0, 25, 50 y 75%).

Para llevar a cabo la retrotranscripción de los RNA's tratados con DNAsa se utilizó el kit GoScript™ Reverse Transcription System. Al obtener los cDNA's se llevó a cabo un gel (2X, Buffer TAE 1X, 90 volts por 2 h) buscando la amplificación del gen constitutivo (Figura 20) y las lecturas en el nanodrop marcaron concentración promedio de 100 ng/μL y pureza promedio 1.7-1.9 en relación 260/230.

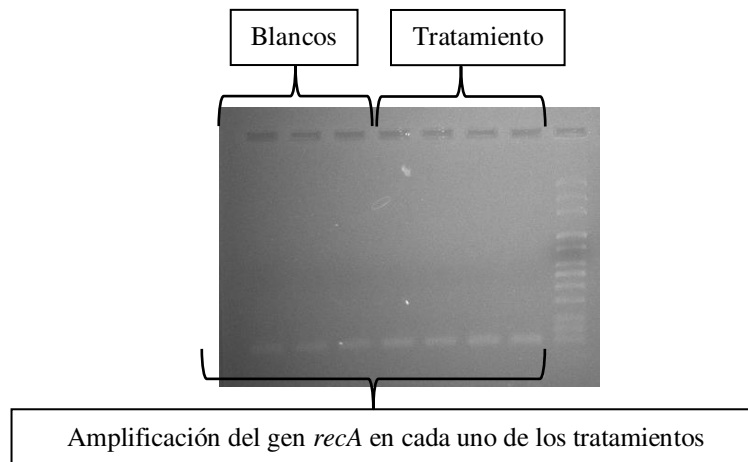
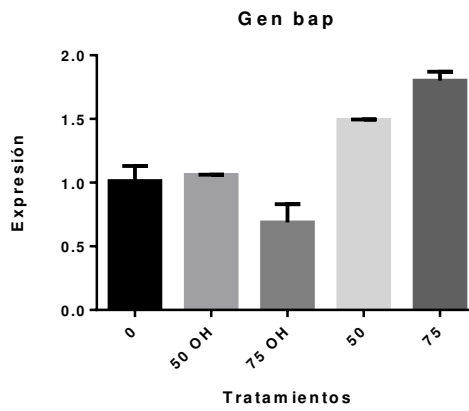


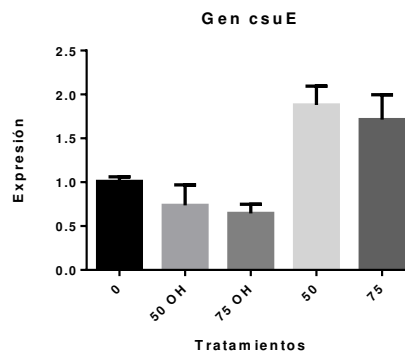
Figura 15. Amplificación del gen constitutivo *recA* (105 pb) en los cDNA's blancos y tratamientos (0, 25, 50 y 75 % de izquierda a derecha).

Con las muestras de cDNA obtenidas, se realizó la técnica de qPCR; se tomó como referencia la expresión del gen constitutivo en el control con las muestras del 50 y 75%.

Los resultados de la qPCR se muestran en las gráficas 9 y 10, en ellas el 50 OH y 75 OH representan los blancos de los tratamientos. Para la cuantificación por qPCR se utilizaron los genes *bap* y *csuE*, debido a su importancia en la formación de la biopelícula.



Gráfica 9. Expresión del gen *bap* con respecto a al control.



Gráfica 10. Expresión del gen *csuE* con respecto a al control.

Al observar una ligera sobreexpresión de los genes *csuE* y *bap* en los tratamientos, se decidió llevar a cabo la evaluación del gen *abaI* (autoinductor; encargado del *quorum sensing* en la formación de biopelículas).

Como se describe en la metodología, los primers fueron diseñados y se utilizaron las siguientes secuencias:

F-CCCACCACACAACCCTATTTA

R- AGCCTGACTGCTAGAGGAA

Se obtuvo con PCR convencional la amplificación del gen, dando un fragmento de 144 pb (Figura 21), con esto se verificaron las características anteriormente mencionadas para los demás genes, modificando la TM a 60°C.

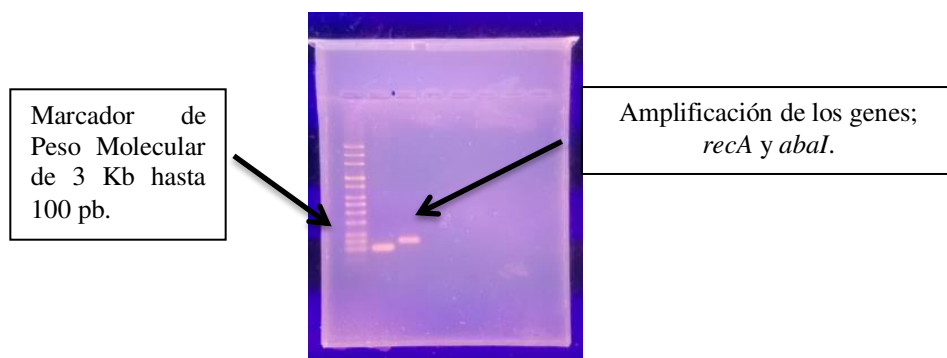
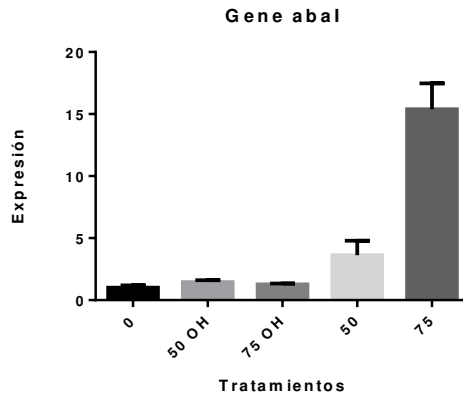


Figura 16. De izquierda a derecha; marcador de peso molecular, gen *recA* (105 pb) y gen *abaI* (144 pb).

Al corroborar la presencia del gen *abaI* dentro de la secuencia de *A. baumannii*, se llevó a cabo el análisis de expresión por qPCR con las características descritas anteriormente, modificando solamente la TM a 60°C.

Los resultados muestran una marcada sobreexpresión del autoinductor en los tratamientos del 50 y 75% de las concentraciones sub-letales, como se observa en el Gráfico 11.



Gráfica 11. Expresión del gen *abal* con respecto a al control.

7.18 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido de la interacción entre *A. baumannii* y extractos de plantas.

En la Figura 17 se observan las células bacterianas adheridas al fondo de la placa de 24 pozos, después del tratamiento con las concentraciones sub-letales de la CMB del extracto de *N. bivalve*. Se observa un cambio en los tratamientos con respecto al control (0%) y los blancos de cada tratamiento; hay un daño en la formación de la biopelícula a simple vista.

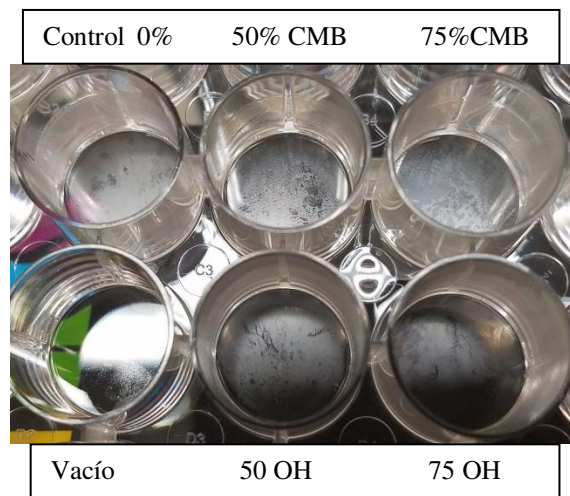


Figura 17. Biopelículas fondo de la microplaca, después del tratamiento con las concentraciones sub-letales de la CMB del extracto de *N. bivalve*.

La Figura 18 muestra las diferentes interacciones entre *A. baumannii* y el extracto de *N. bivalve* bajo microscopía electrónica de barrido a una magnificación de 11,000 X. En el tratamiento del 75% de la CMB (C) puede observarse un cambio en significativo en la conformación de la biopelícula con respecto al control (A) y blancos (D y E).

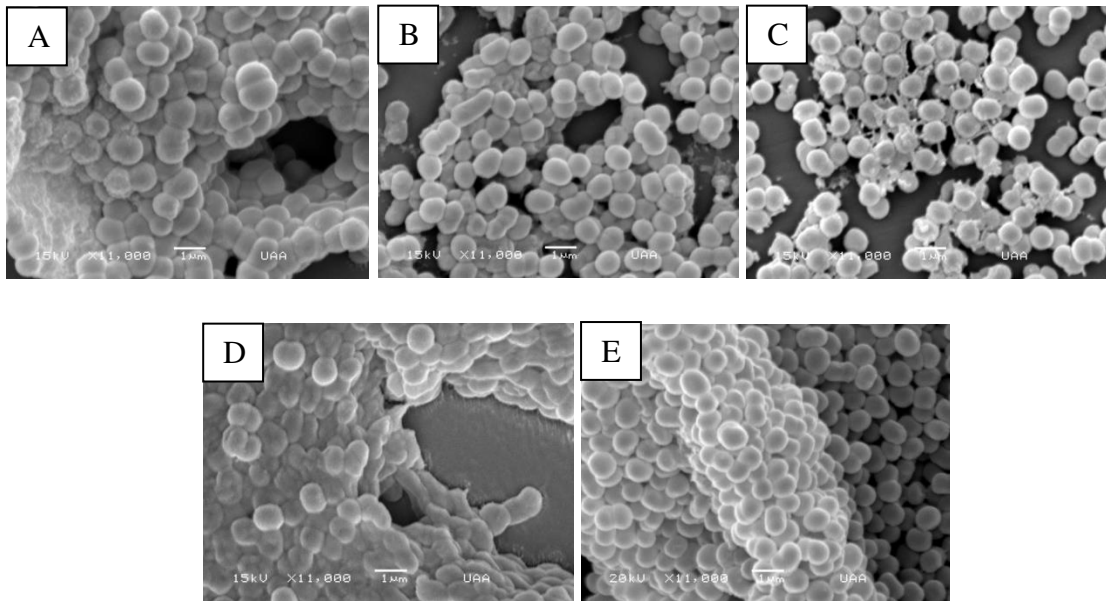
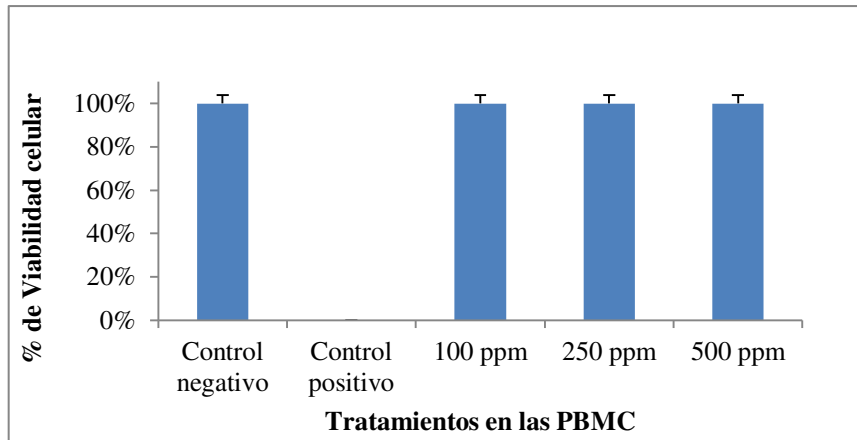


Figura 18. Microscopía electrónica de barrido entre las concentraciones sub-letales de la CMB del extracto de *N. bivalve* y el microorganismo *A. baumannii*; (A) Control, (B) 50% de CMB, (C) 75% CMB, blancos del 50 OH (D) y 75 OH (E).

7.19 Citotoxicidad en línea celular normal PBMC

Los ensayos con las PBMC mostraron que, a las concentraciones evaluadas de 100, 250 y 500 ppm del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH presentaron un 100% de viabilidad con respecto al control negativo, siendo este SDS al 10% en HCl 0.1 N, el cual causa muerte celular (Gráfica 12, Figura 19). Al igual que los ensayos de *A. salina* y hemólisis puede observarse que dicho extracto no presentó toxicidad y/o citotoxicidad.



Gráfica 12. Porcentaje de viabilidad en células PBMC por efecto del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH.

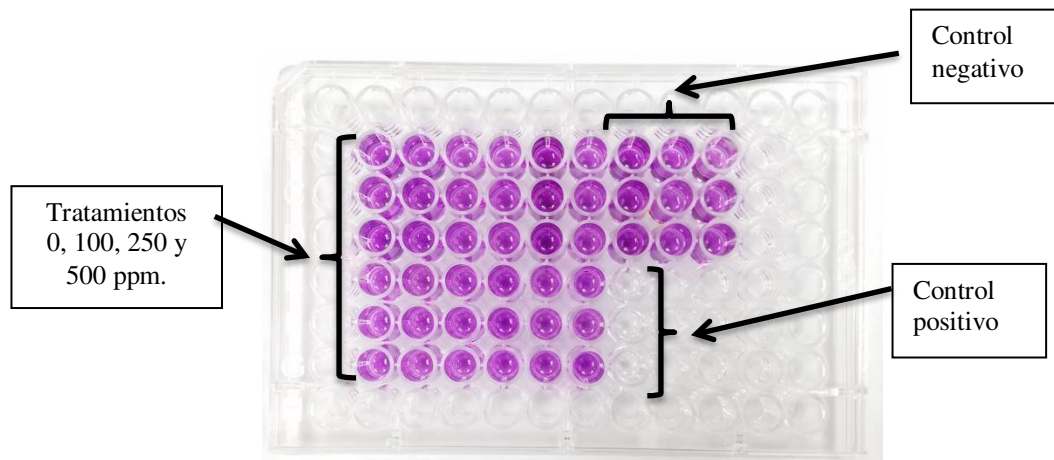
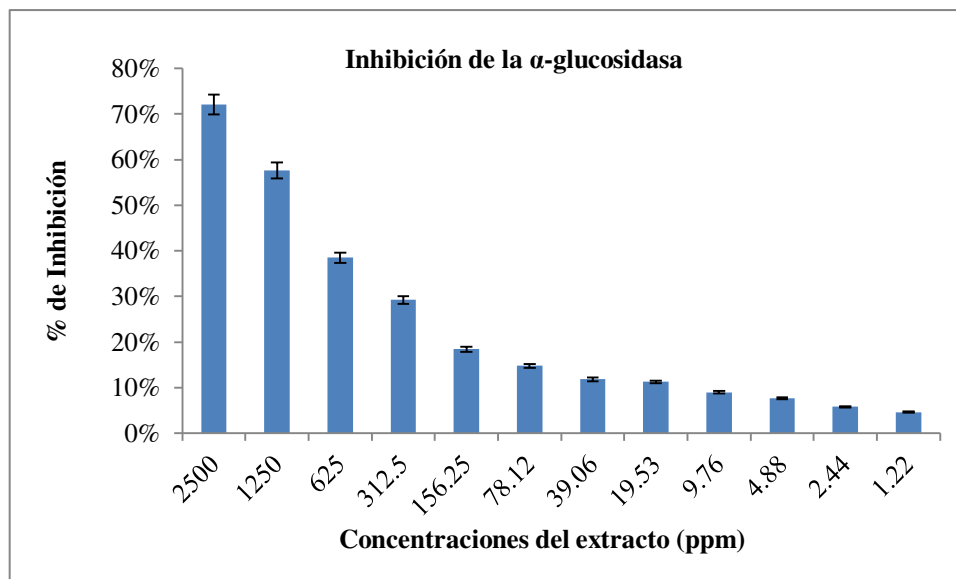


Figura 19. Viabilidad de las células PBMC (cristales de formazan disueltos).

7.20 Inhibición de la enzima α -glucosidasa

Con respecto a la inhibición de la enzima, α -glucosidasa por efecto del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH, mostró poca actividad. En la Gráfica 13, se observan las concentraciones de 2500 hasta 1.22 ppm del extracto y el porcentaje de inhibición de la enzima con respecto al control negativo, puede apreciarse que al aumentar la cantidad de extracto a evaluar, existe mayor inhibición de la enzima.

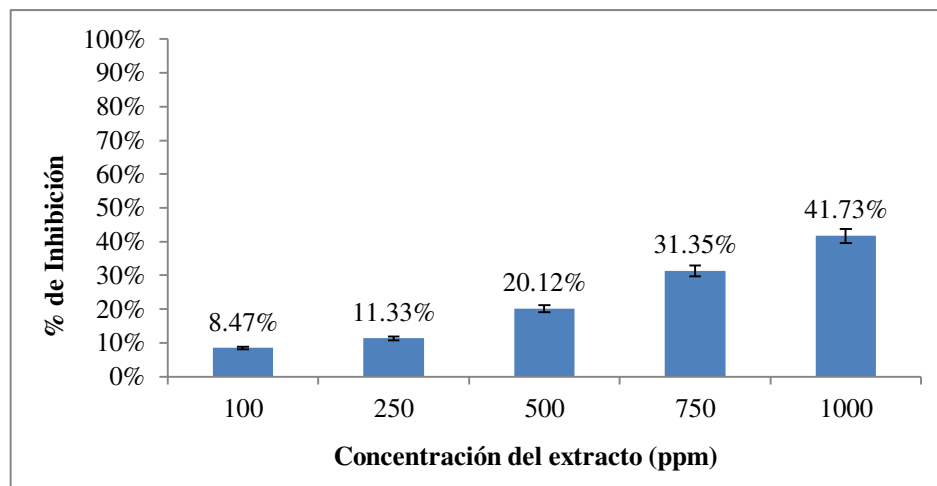


Gráfica 13. Porcentaje de inhibición de la α -glucosidasa con las diferentes concentraciones del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH.

Con los valores obtenidos fue de cálculo la CI_{50} del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH; con un valor de $1,393 \pm 13$ ppm y la acarbosa (control positivo) con un valor de 331 ppm.

7.21 Actividad antiurolítica

Los resultados de la actividad antiurolítica *in vitro* por parte del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH, se muestran en la Gráfica 14. En la concentración de 1000 ppm se obtuvo una inhibición de 41.73% con una CI_{50} de $1,141 \pm 30$ para al control positivo ($C_6H_5K_3O_7$) un 100% de inhibición a 5000 ppm.



Gráfica 14. Porcentaje de inhibición de la nucleación con las diferentes concentraciones del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH.

7.22 Aislamiento e identificación de compuestos activos de *Parthenium incanum*

Para el aislamiento e identificación de los metabolitos de *P. incanum*, se realizó de la extracción tipo Soxhlet; ya que presentó baja toxicidad en *A. salina* y baja citotoxicidad por hemólisis.

7.22.1 Pruebas químicas realizadas al extracto.

La Tabla 18, muestra los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto, destacando la presencia de esteroides y triterpenos, así como de las sesquiterpenlactonas los cuales son características del género *Parthenium*.

Tabla 18. Tamizaje fitoquímico del extracto de *P. incanum* Soxhlet MeOH.

Prueba Química	<i>P. incanum</i>
KMNO ₄ (Dobles enlaces)	+
2-4 DNFH (carbonilo)	+
Liebermann-Burchard (Esteroles y Triterpenos)	+
NaOH (Cumarinas)	+
Dragendorff (Alcaloides)	+
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	+
H ₂ SO ₄ (Quinonas)	-
NaHCO ₃ (Grupo Carboxilo)	-
FeCl ₃ (Taninos)	+
Espuma (Saponinas)	-
Antrona (Carbohidratos)	+
Shinoda (Flavonoides)	+

7.22.2 Cromatografía en columna.

La columna cromatográfica fue eluída como se describe en la metodología, obteniendo fracciones de 100 mL. Dichas fracciones fueron comparadas por TLC, para mezclar aquellas que presentaban alto porcentaje de similitud (Figura 20); obteniéndose al final un total de 50 fracciones.

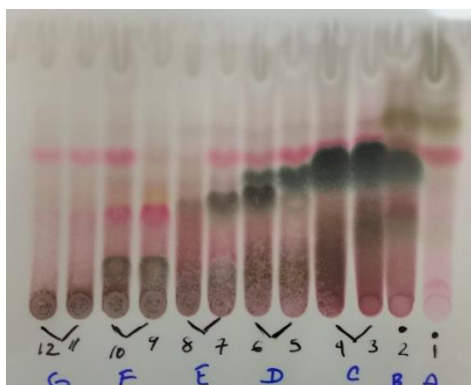


Figura 20. Comparación de las fracciones obtenidas por TLC, eluídas cloroformo: acetona 7:3 y revelados con p-anisaldehído/ác. sulfúrico.

Todas las fracciones resultantes, fueron evaluadas por la técnica de difusión de pozo en agar, para seleccionar aquellas que presentaban actividad antimicrobiana. Se

obtuvieron 5 fracciones activas (C, D, E, F y G), obtenidas de un gradiente 9.5/0.5 a 9/1 cloroformo: metanol en la columna cromatográfica. El peso de las fracciones oscilaba entre los 100 y 150 mg.

7.22.3 Bioautografía.

Con una de las fracciones se realizó una bioautografía, donde se obtuvo inhibición a un Rf de entre 0.5 a 0.55, con la fase móvil cloroformo: acetona 7:3. La Figura 21 muestra el resultado de la inhibición del microorganismo, además se observa una banda oscura (UV de 365 nm) como la responsable de la actividad.

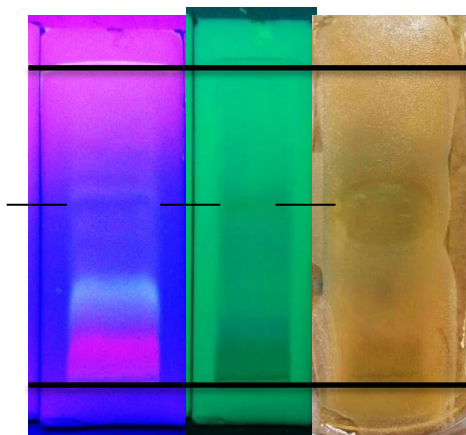


Figura 21. Bioautografía con zona de inhibición con Rf entre 0.50 a 0.55; cromatoplasmas observadas de izquierda a derecha 365 nm (UV), 254 nm y resultado positivo.

7.22.4 Cromatografía en columna para las fracciones activas seleccionadas.

En esta cromatografía en columna se colocaron 120 mg de la fracción. La elución se llevó a cabo con 300 mL cloroformo: acetona 7:3 y se colectaron fracciones de 4.5 mL. Al tener las sub-fracciones evaporadas éstas fueron resuspendidas en metanol y se corrió una TLC cloroformo: acetona 6:2 y revelada con vainillina/ácido sulfúrico, se observó una banda color azul violáceo con un Rf de 0.6 (Figura 22).

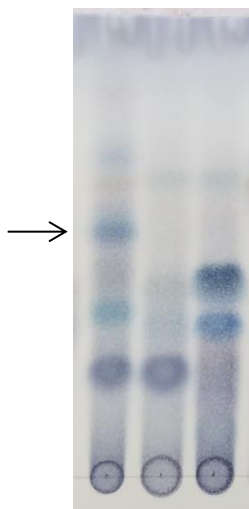


Figura 22. Sub-fracciones evaluadas por TLC, fase móvil cloroformo: acetona 6:2 y revelado con vainillina/ác. sulfúrico.

7.22.5 Pruebas químicas y reveladores específicos para las sub-fracciones.

La sub-fracción con un R_f de 0.6 fue sometida a pruebas químicas; mostrando presencia de esteroides, triterpenos y sesquiterpenlactonas positivo.

7.22.6 Cromatografía en capa fina preparativa.

Para la obtención de la banda activa, se recurrió a un raspado de una cromatografía en capa preparativa (Figura 23); la sub-fracción que contenía la banda fue eluída con la fase móvil antes mencionada. Ya evaporado el solvente se procedió al raspado de la banda, la recuperación de la banda activa se realizó con metanol, fue centrifugada a 12,000 rpm. La banda se colocó en un vial ámbar, el solvente fue evaporado y se obtuvieron cerca de 9 mg de banda activa.

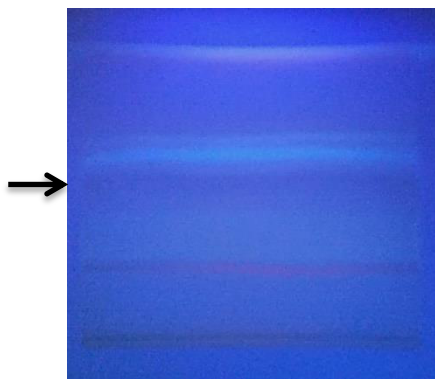


Figura 23. TLC preparativa de la sub-fracción, fase móvil cloroformo: acetona 6:2.

7.22.7 Espectroscopia de infrarrojos con transformación de Fourier (FT-IR) y pruebas químicas a la banda activa.

Para el análisis espectroscópico por infrarrojos se utilizaron 2 mg de la muestra; donde se observaron las señales de los grupos funcionales de la banda activa: $3,396\text{ cm}^{-1}$ (OH), $2,924$ y $2,854\text{ cm}^{-1}$ (CH_2), $1,707\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$), $1,457\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{C}$), $1,377\text{ cm}^{-1}$ (CH_3) y $1,104\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}-\text{O}$) (Figura 24).

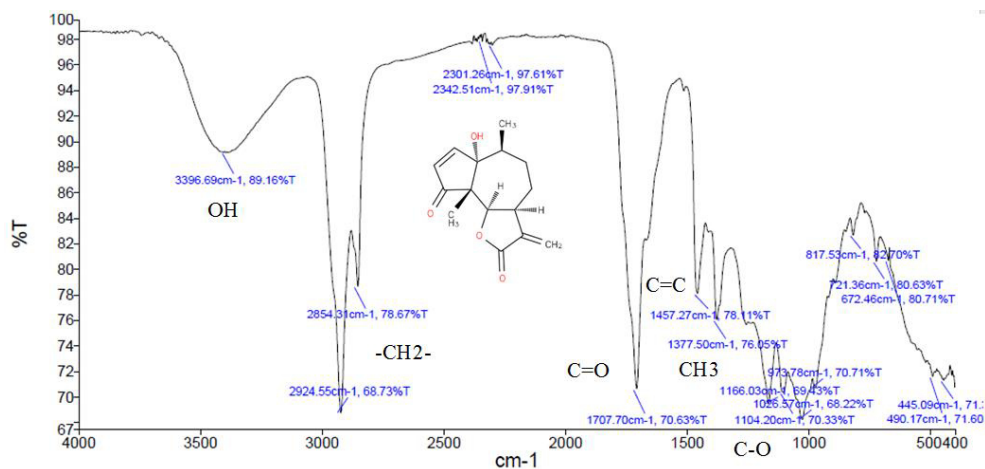


Figura 24. Grupos funcionales de la banda activa por FT-IR.

7.22.8 Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a masas (HPLC-MS) y caracterización de los compuestos de *P. incanum*.

Finalmente 5 mg de la banda activa fue evaluada por HPLC-MS para corroborar la presencia de partenina. Primeramente, la banda activa fue disuelta en metanol grado HPLC-MS y fue filtrada utilizando un filtro de Nylon de 0.22 μm . En seguida se estandarizaron las condiciones óptimas para su separación.

La separación cromatográfica se realizó empleando una columna Discovery HS F5 (150 x 2.1 mm, 3 μm ; Superlco). Como fase móvil una mezcla de una solución acuosa de ácido acético (2 %) y acetonitrilo, iniciando con 5 % de acetonitrilo durante 5 min, después se incrementó linealmente hasta 50 % en 50 min, posteriormente se incluyó un periodo de 10 min con 80% de acetonitrilo para eluir los compuestos de la muestra que pudieran quedar retenidos, regresando a las condiciones iniciales en el minuto 60 y acondicionando 20 min ante de la siguiente inyección. El flujo de fase móvil fue 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, la temperatura de la columna se mantuvo a 50 °C y la de las muestras a 20 °C. El volumen de inyección utilizado fue de 10 μL .

La detección se realizó por espectrometría de masas con una fuente de electrospray y analizador de trampa de iones. Se utilizó nitrógeno a un flujo de 40 unidades como gas de nebulización (*sheath gas*) y a un flujo de 10 unidades como gas de secado. La ionización se realizó en modo positivo, el voltaje del capilar de *electrospray* utilizado fue de 5 kV, mientras que el voltaje del capilar de desolvatación fue de 10 (V) y su temperatura de 325 °C. El voltaje del tubo de lentes se fijó en 60 V. La adquisición de datos se realizó en modo positivo e incluyó un barrido completo (*full scan*) de m/z 100 a 1000 y experimentos de masas/masas para el ion pseudomolecular de partenina (m/z 263) y coronopilina (265), utilizando el modo de disociación inducida por colisión (*collision induced dissociation, CID*), con una energía de colisión normalizada (*normalized collision energy*) de 24.5 %, una ventana de aislamiento (*isolation width*) de 0.9 m/z , un voltaje de RF de activación (*activation Q*) de 0.25, un tiempo de activación de 30 ms y un intervalo de barrido de m/z 100 a 300.

Se realizó la búsqueda de los pseudoiones moleculares 263 y 265 (m/z), que corresponden a la partenina y coronopolina se debe a la gran similitud entre estas moléculas, debido a las referencias bibliográficas y los resultados de los ensayos anteriores. En las condiciones utilizadas, las señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 263 (que correspondería idealmente al pseudo ión molecular de partenina) presentaron un tiempo de retención de 23.6 y 27.7 min (Figura 25), mientras que para iones a m/z 265 (que correspondería idealmente al pseudo ión molecular de coronopolina) las señales presentaron tiempos de retención 26.3 y 27.9 min (Figura 26).

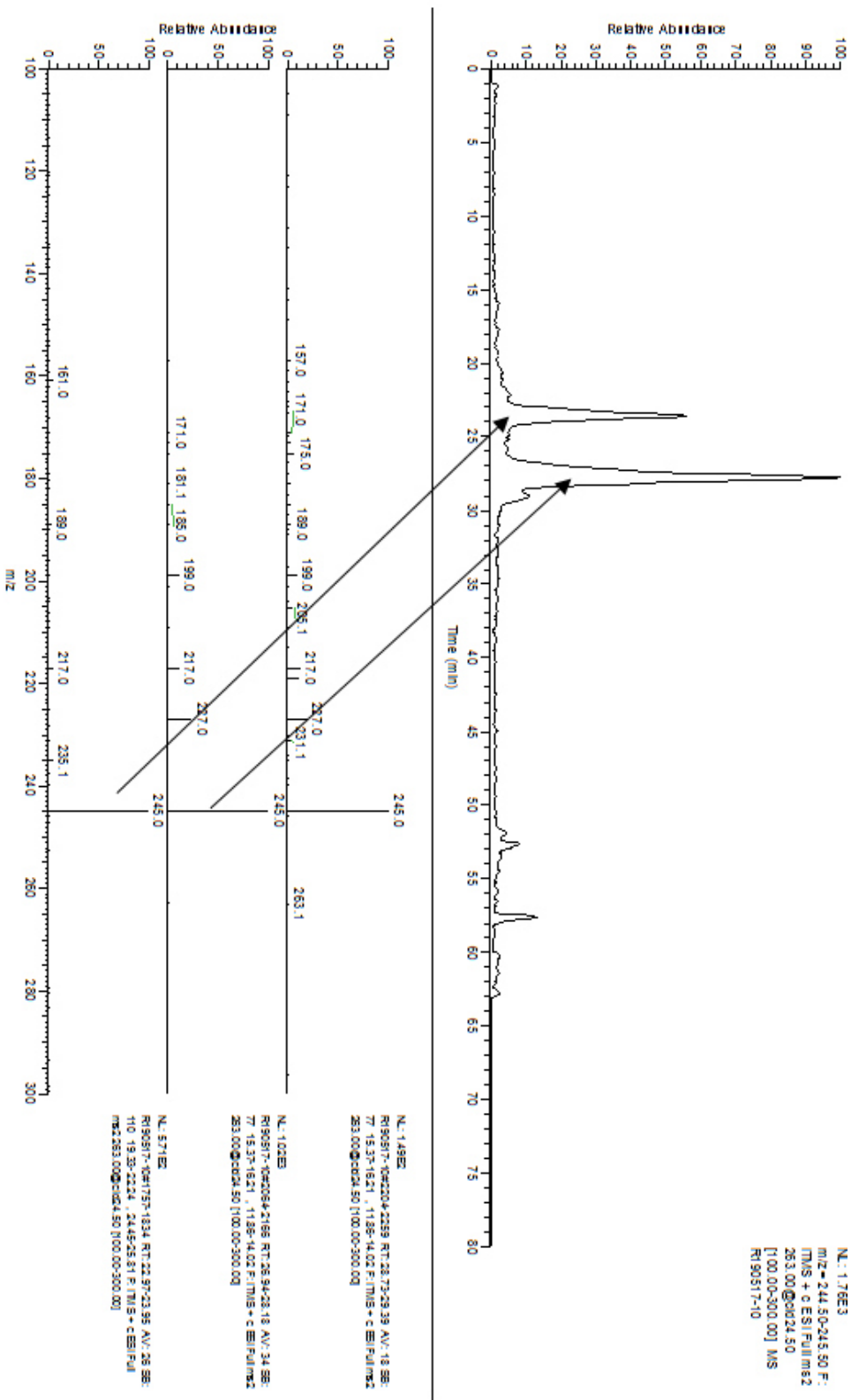
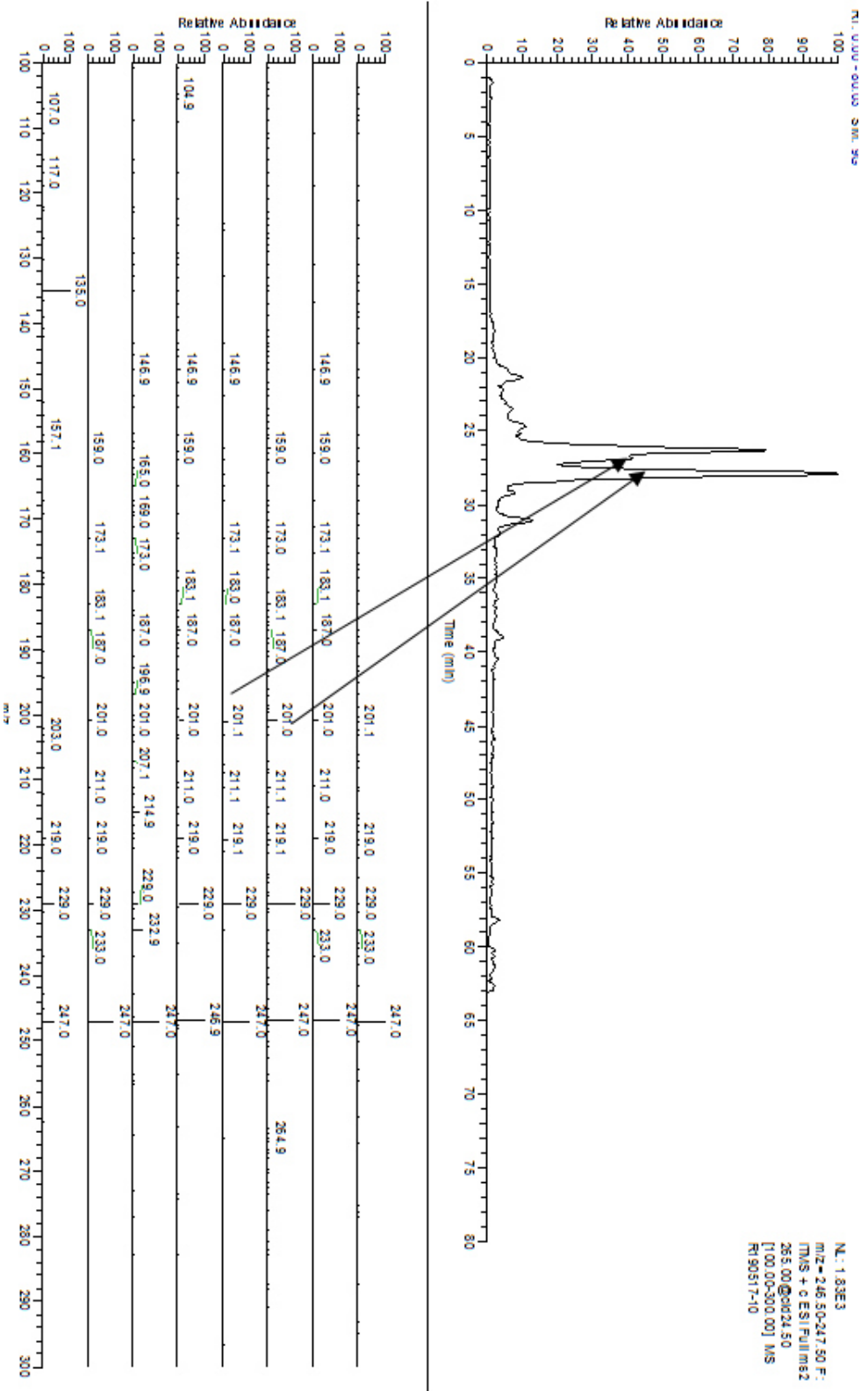


Figura 25. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 263, presentando tiempos de retención de 23.6 y 27.7 min.



NL: 1.8383
 M/Z: 265.0-247.50 F:
 IONS: + C ESI FULL MS2
 265.00 @ 26.34.50
 [100.00-300.00] MS
 R190517-10

Figura 26. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 265, presentando tiempos de retención 26.3 y 27.9 min.

En las Figuras 25 y 26 se muestran los cromatogramas obtenidos en la separación por el HPLC-MS, en la parte inferior de cada imagen se observan las fragmentaciones de las moléculas. Es por ello que se muestran a continuación las fragmentaciones de cada uno de ellos (Figura 27 y Figura 28):

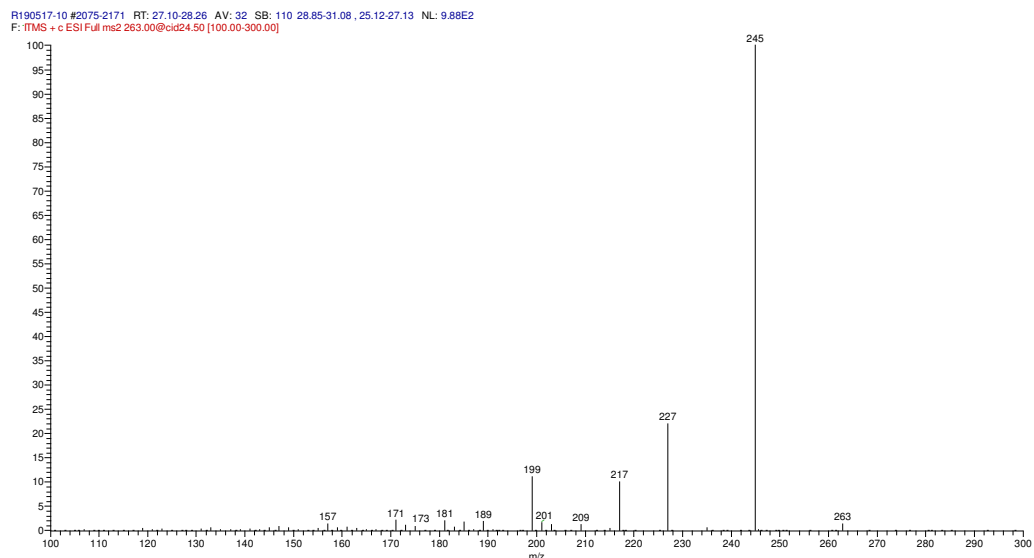


Figura 27. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 263; extracción por Soxhlet (partenina).

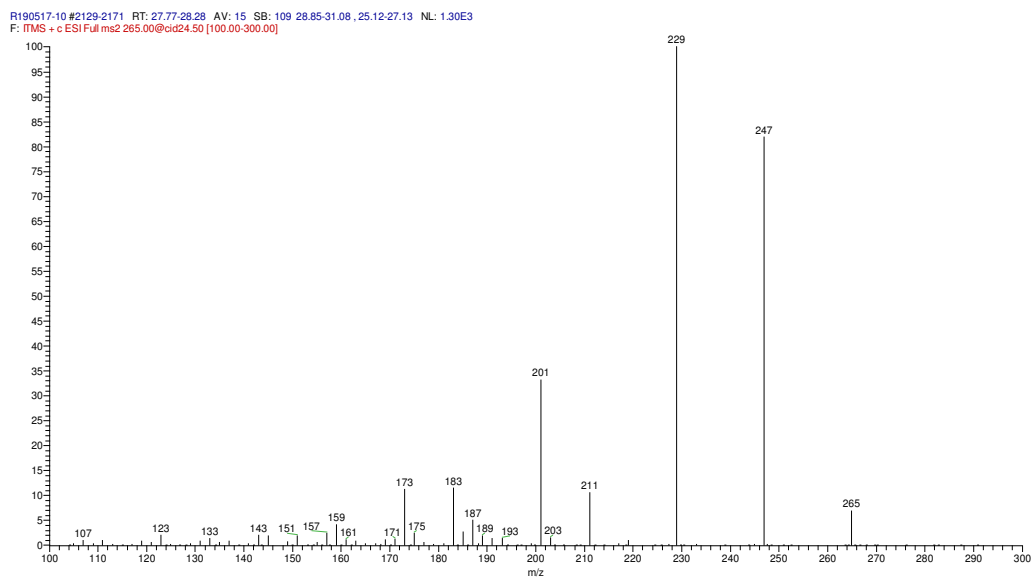


Figura 28. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 265; extracción por Soxhlet (coronopolina).

NOTA: Al comprobar la presencia de la partenina y la coronopolina en el extracto (Soxhlet), se decidió analizar el extracto por maceración de la misma planta para corroborar la presencia de ambos metabolitos. Se realizó lo anteriormente mencionado, pero hasta la identificación de las fracciones activas, observando que aquellas que presentaban actividad antimicrobiana poseían la banda de la partenina (Figura 29). En resumen, se obtuvieron 53 fracciones de la columna del extracto por maceración; al ser comparadas, las fracciones fueron eluías con cloroformo: acetona 6:2, y sólo aquellas que presentaban compuestos con esa elución fueron separadas, siendo 9 fracciones. Sólo 6 fracciones de los gradientes 9.5/0.5 a 9/1 cloroformo: metanol de la columna cromatográfica; mostraron la banda característica y al evaluarlos presentaron la actividad.

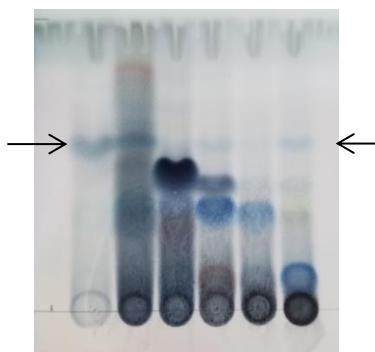


Figura 29. De izquierda a derecha; compuesto obtenido del extracto Soxhlet (referencia), fracción del gradiente 9:1 cloroformo: metanol de Soxhlet y 4 fracciones del gradiente 9:1 cloroformo: metanol de maceración. Todas muestran la presencia de partenina.

La fracción con menos compuestos visibles fue analizada por HPLC-MS; se procedió de la misma manera que para la banda activa, obteniéndose los siguientes resultados:

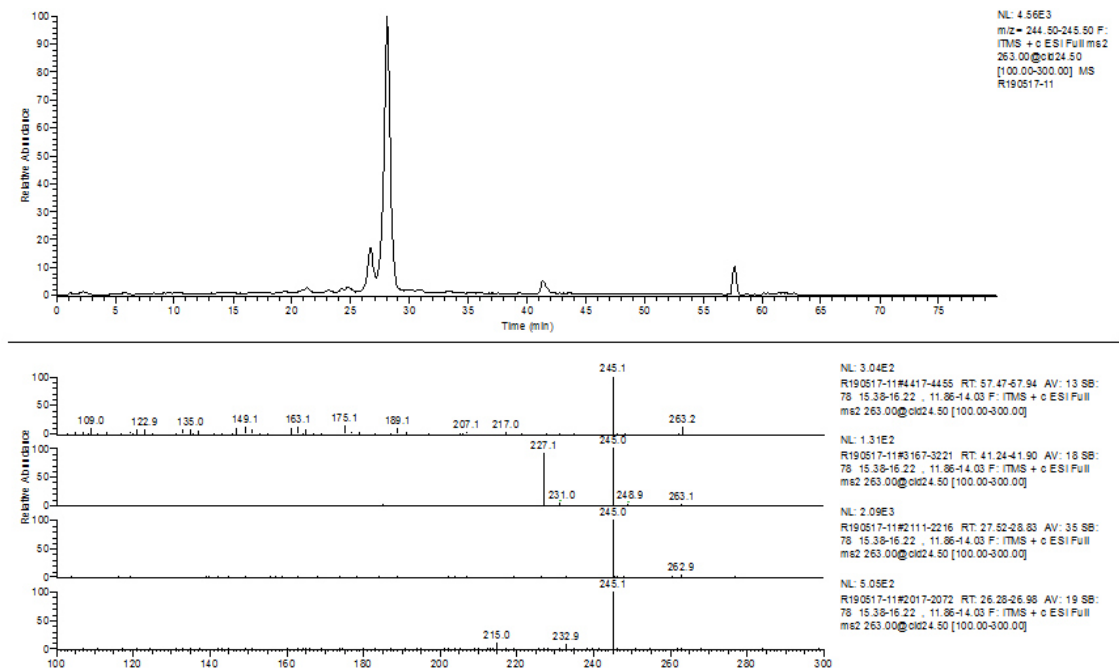


Figura 30. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 263, presentando tiempos de retención de 26.28 y 27.52 min.

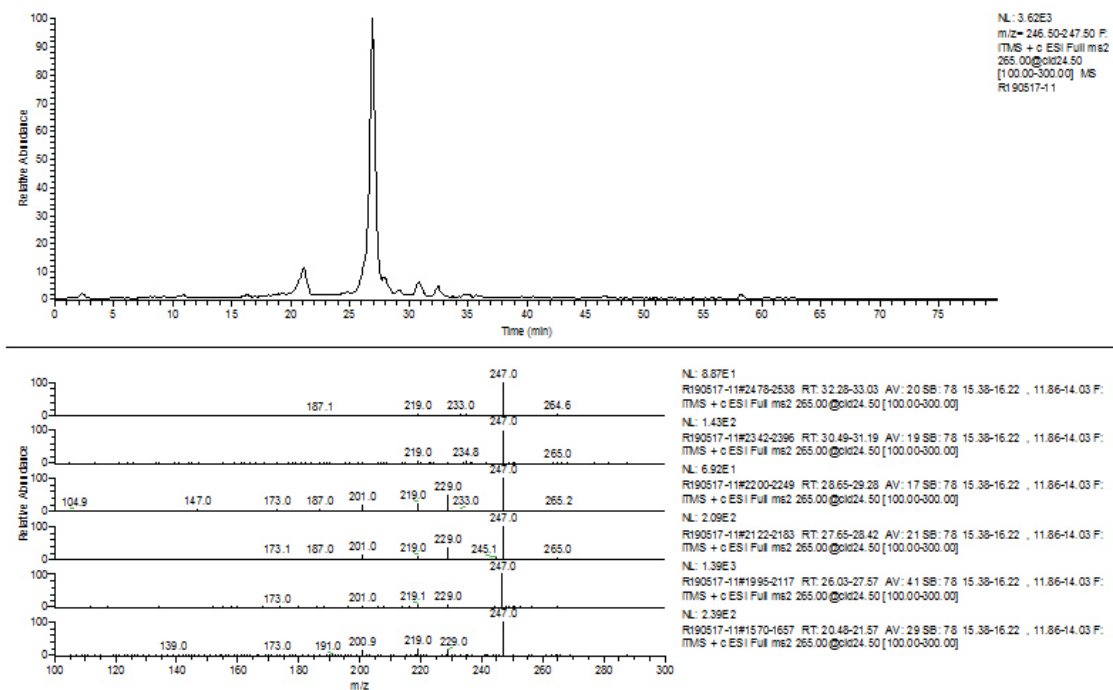


Figura 31. Señales obtenidas en los experimentos de masas/masas para una m/z 265, presentando tiempos de retención de 20.48 y 26.03 min

Se observa que en las Figuras 30 y 31 muestran la presencia de los pseudoiones moleculares 263 y 265 m/z, estos corresponden a la partenina y coronopolina, respectivamente. Al igual que los cromatogramas anteriores, pueden observarse sus tiempos de retención son muy similares, oscilando las señales mayoritarias entre los 26 a 28 min de retención. Así mismo se muestra la fragmentación obtenida anteriormente para el extracto por Soxhlet (Figuras 32 y 33). Esto permite demostrar la presencia de partenina y coronopolina en ambos métodos de extracción.

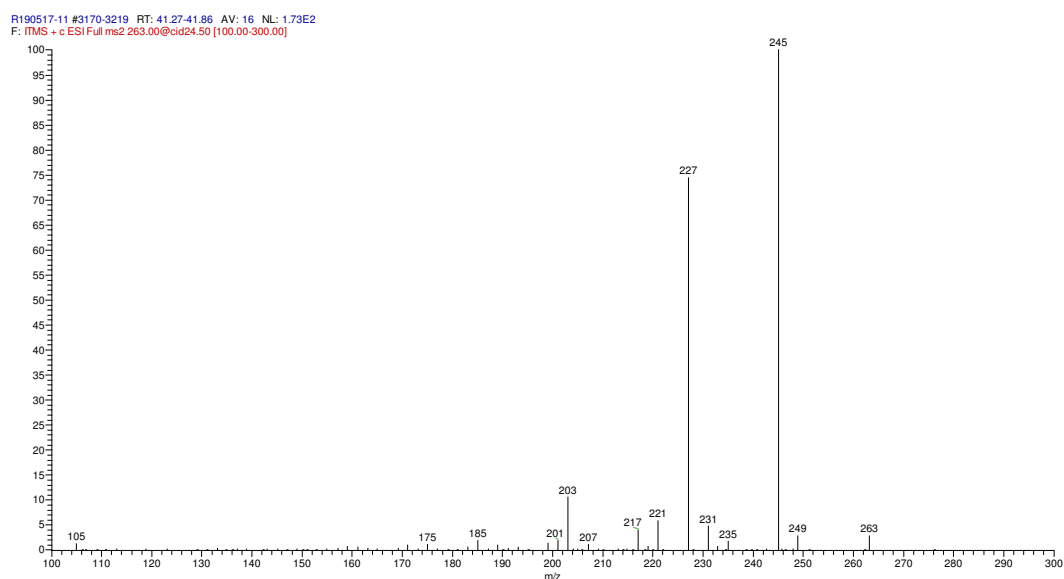


Figura 32. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 263; extracción por maceración (partenina).

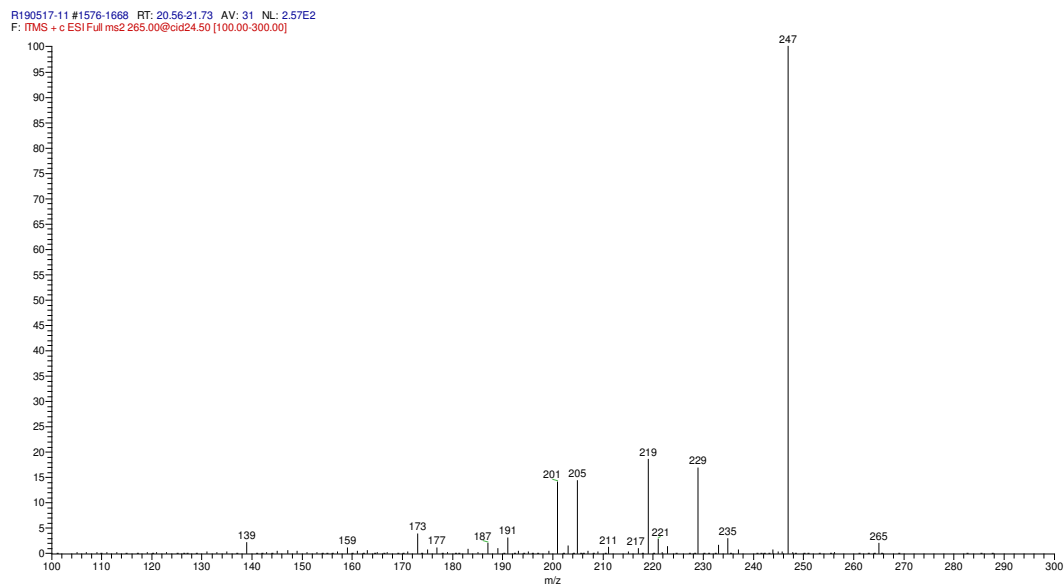


Figura 33. Fragmentación obtenida para el pseudo ión molecular 265; extracción por maceración (coronopolina).

7.23 Aislamiento e identificación de compuestos activos de *Nothoscordum bivalve*

Para *N. bivalve*, el aislamiento e identificación de sus metabolitos se llevó a cabo para el extracto proveniente de una extracción tipo Soxhlet; ya que presentó baja toxicidad en *A. salina* y baja citotoxicidad por hemólisis; no afectó los tiempos de coagulación, inhibió la formación de biopelículas en *A. baumannii* y además no presentó citotoxicidad en células PBMC.

7.23.1 Pruebas químicas realizadas al extracto

La Tabla 19, muestra los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto. Destacando la presencia de Esteroles y Triterpenos, Cumarinas, Alcaloides, Taninos, Carbohidratos y Flavonoides.

Tabla 19. Tamizaje fitoquímico del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH.

Prueba Química	<i>N.bivalve</i>
KMNO ₄ (Dobles enlaces)	+
2-4 DNFH (carbonilo)	-
Liebermann-Burchard (Esteroles y Triterpenos)	+
NaOH (Cumarinas)	+
Dragendorff (Alcaloides)	+
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	-
H ₂ SO ₄ (Quinonas)	-
NaHCO ₃ (Grupo Carboxilo)	-
FeCl ₃ (Taninos)	+
Espuma (Saponinas)	-
Antrona (Carbohidratos)	+
Shinoda (Flavonoides)	+

7.23.2 Bioautografía preliminar del extracto

Se realizó la cromatografía con fase móvil cloroformo: metanol 9:1. Posteriormente la bioautografía, observándose una zona de inhibición con Rf's entre 0.5 a 0.6. (Figura 34).

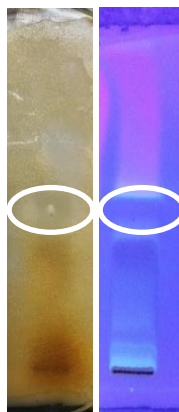


Figura 34. Bioautografía preliminar del extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH.

7.23.3 Cromatografía en Columna del extracto

Después de realizar el tamizaje fitoquímico y observar los resultados de la autobiografía, se montó una columna cromatográfica de 45 cm, de alto con un diámetro de 2.5 cm; utilizando 9 g de extracto.

La elución de la columna se realizó con mezclas de cloroformo: metanol; de la siguiente forma: se inició sólo con cloroformo 10:0 (cloroformo), posteriormente se agregó metanol quedando los gradientes CHCl_3 :MeOH 9.75:0.25, 9.5:0.5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 y al final solo metanol colectando 100 mL en matraces de 250 mL (Figura 35), se utilizaron 1.2 L por cada fase móvil.

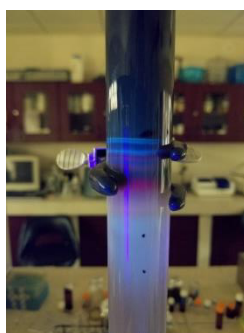


Figura 35. Elución de la columna cromatográfica con el gradiente cloroformo.

Al finalizar la elución de la columna, se obtuvieron un total de 84 fracciones, las cuales fueron comparadas mediante TLC utilizando una fase móvil 9:1 cloroformo: metanol, después de la elución las placas fueron reveladas con cloruro de cobalto (Figura 36). Todas aquellas fracciones similares se mezclaron obteniendo 54 fracciones, con un peso de 40 a 185 mg. Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones mediante la técnica de difusión de pozo en agar, previamente descrita. La actividad antimicrobiana se observó en las primeras 8 mezclas de fracciones como se aprecia en la (Figura 37).

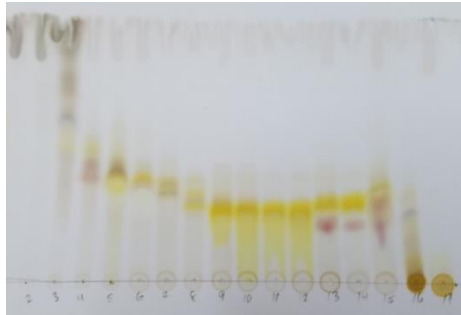


Figura 36. Comparación en TLC de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del extracto de *N. bivalve*.

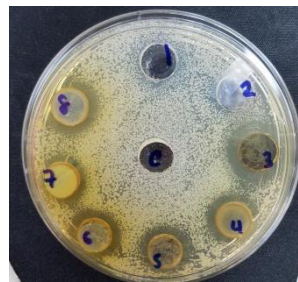


Figura 37. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la mezcla de fracciones obtenidas.

7.23.4 Bioautografías de las fracciones activas.

Primeramente, se estableció la fase móvil adecuada para la separación de los componentes; siendo esta 80:15:5 cloroformo: acetona :metanol (Figuras 38 - 41).

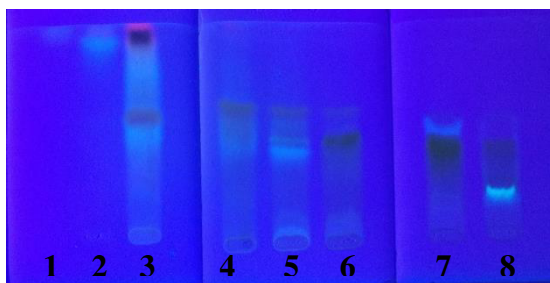


Figura 38. Luz UV a 365 nm.

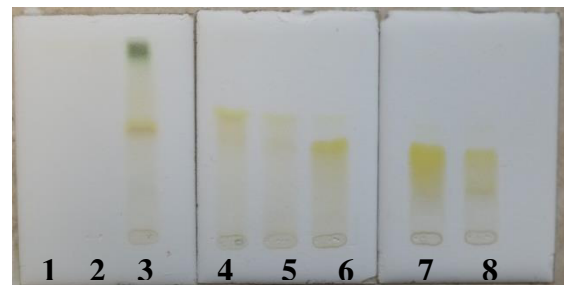


Figura 39. Revelado con Cloruro de cobalto.

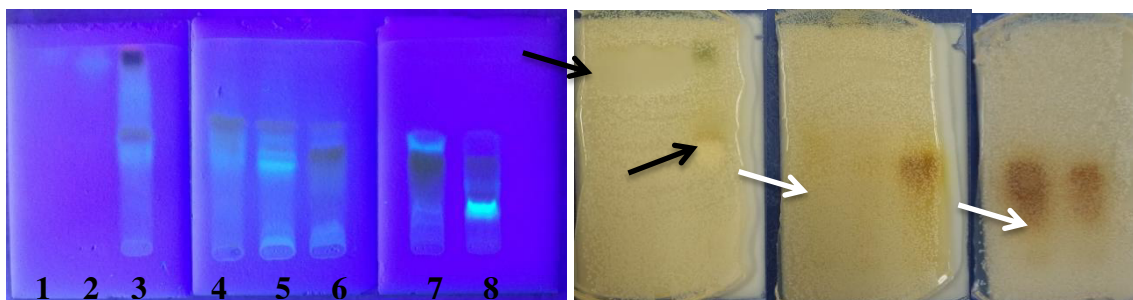


Figura 40. Luz UV 365nm después del revelado.

Figura 41. Zonas con actividad (negro inhibición, blanco disminución).

7.23.5 Subfraccionamiento de las fracciones activas y TLC preparativas.

7.23.5.1 Fracciones 1 y 2

Para las fracciones 1 y 2 se llevó a cabo una nueva TLC comparativa modificando la fase móvil a hexano:acetona 7:3 para observar que bandas eran similares y así obtener el compuesto bioactivo (Figura 42).

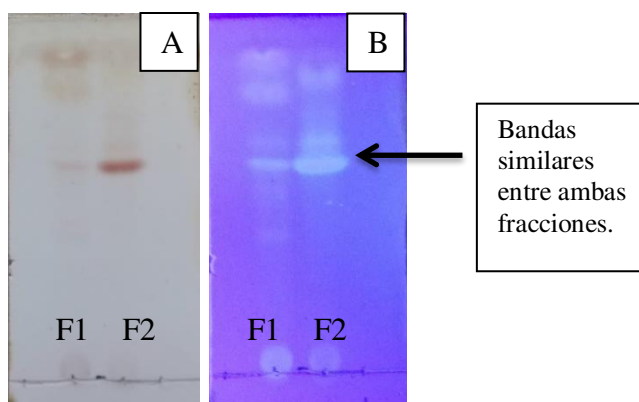


Figura 42. Separación en TLC de las fracciones 1 y 2; A) Revelado con Cloruro de cobalto y B) visualización a la UV de 365 nm después del revelado.

Después de comparar las bandas entre las fracciones 1 y 2; se decidió recuperar de la fracción 2 las bandas similares, por ello se llevó a cabo una TLC preparativa (hexano: acetona 7:3) (Figura 43). Después del revelado se observó una banda azul brillante con un Rf aproximado de 0.65.

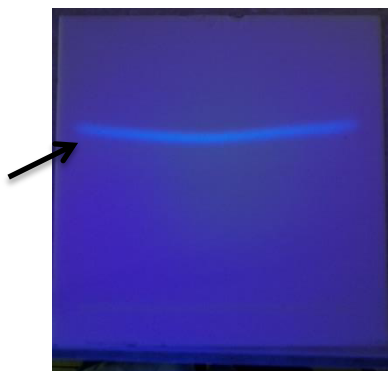


Figura 43. TLC preparativa de la fracción 2, visualización por luz UV 365 nm.

La banda fue raspada de la silica y recuperada mediante 3 lavados con MeOH. Para filtrar la silica, se utilizaron membranas de nylon de 0.22 μm , se obtuvo una cantidad de 26 mg.

Para corroborar su pureza, la banda fue eluída nuevamente en TLC con las condiciones anteriormente descritas y se observó que no presentaba una pureza del 100 %, ya que después de revelar la placa se observó una banda con un Rf diferente de color café y a la luz UV de 365 nm se logró apreciar dos bandas más (Figura 44).

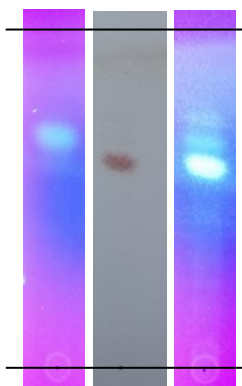


Figura 44. TLC del raspado de la fracción 2, de izquierda a derecha; UV 365 nm, revelado con cloruro de cobalto, UV 365 nm después del revelado.

El compuesto obtenido fue nombrado como Región 1 (R1) al apreciar que no se encontraba puro.

7.23.5.2 Fracción 3

Para la fracción 3, se llevó a cabo una nueva columna cromatográfica, de 45 cm de alto y 1 cm de diámetro. Fue eluída con 200 mL de una fase móvil 80:15:5 cloroformo: acetona: metanol, colectando fracciones de 3 mL. Se obtuvieron 35 subfracciones (Figura 45), las cuales fueron comparadas en TLC con la fase móvil mencionada, en busca de aquellas que presentaran bandas visibles a la UV de 365 nm con Rf's aproximados entre 0.6 y 0.75 (Región 2) (Figura 46).



Figura 45. Subfraccionamiento de la fracción 3

La subfracción 13 presentó la región buscada, se llevó a cabo una TLC preparativa para recuperar la mencionada sección (Figura 46).

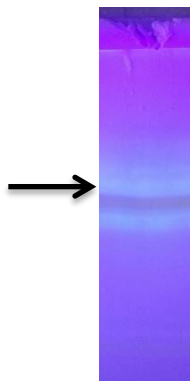


Figura 46. Separación de la subfracción 13; visualización con luz UV de 365 nm.

La R2 fue recuperada de la misma manera que la R1, se recuperaron cerca de 30 mg.

Un análisis por TLC con fase móvil hexano: acetona (7:3) nos permitió observar el número de bandas en la Región 2 (R2). Después del revelado, se observó a luz UV de 365 nm por lo menos 5 bandas contenidas en la R2 (Figura 47).

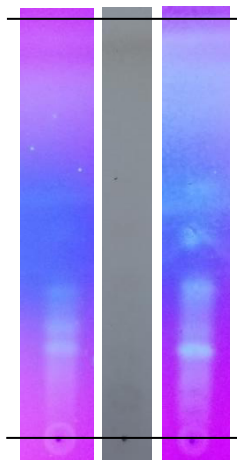


Figura 47. Subfraccionamiento de R2 de la fracción 3, de izquierda a derecha; UV 365 nm, revelado con cloruro de cobalto, UV 365 nm después del revelado.

7.23.5.3 Fracciones 5 y 6

Las fracciones 5 y 6 fueron comparadas para observar si había compuestos similares, en la TLC con fase móvil 80:15:5 cloroformo: acetona: metanol, se observó una región similar al ser visualizada con la luz UV 365 nm, con R_f 's entre 0.45 y 0.65 (Figura 48).

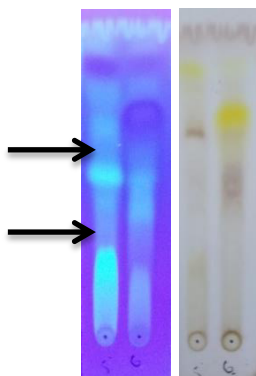


Figura 48. Comparación de las fracciones 5 y 6; análisis por UV de 365 nm y después del revelado.

Al ser identificada la región de interés (R3), se decide seleccionar la fracción 5 para llevar a cabo un nuevo fraccionamiento en una columna de 45 cm de alto y 1 cm de

diámetro, eluyendo 200 mL de la fase móvil 80:15:5 cloroformo:acetona:metanol, colectando de 3 en 3 mL (Figura 49).



Figura 49. Fraccionamiento de la fracción 5 por columna cromatográfica.

Se colectaron 35 subfracciones de las cuales a partir de la número 14 se observa la región de interés (Figura 50).

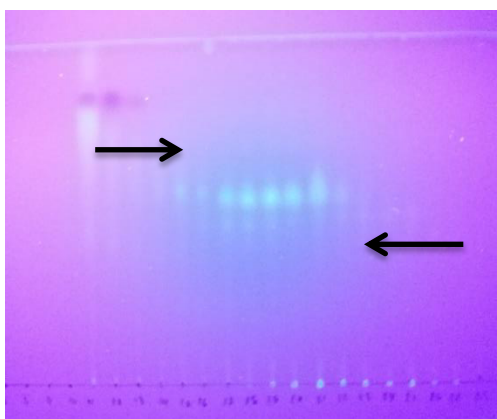


Figura 50. Comparación de las subfracciones obtenidas de la fracción 5.

Se mezclaron las fracciones similares y se corrieron sobre una TLC preparativa para recuperar la región de interés (R3). Se recuperó la sección como se describió anteriormente, al final se obtuvo un peso total de 60 mg.

7.23.5.4 Fracciones 7 y 8

Las fracciones 7 y 8 fueron comparadas mediante TLC de manera previamente descrita. La región de interés R4 se encuentra localizada entre los Rf de 0.2 a 0.35

(Figura 51), se seleccionó la fracción 8 para llevar a cabo una TLC preparativa con la fase móvil anteriormente mencionada y recuperar región activa (Figura 52).

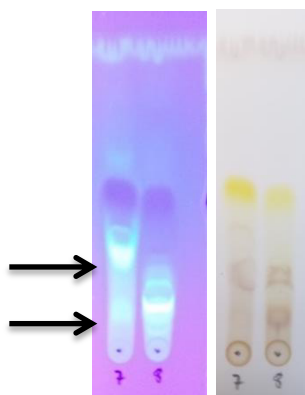


Figura 51. Comparación de las fracciones 7 y 8; visualización a la luz UV 365 nm y después del revelado.

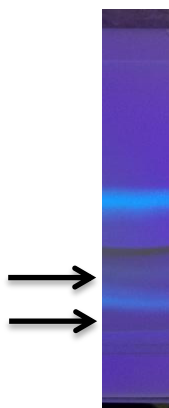


Figura 52. Separación por TLC preparativa de la Fracción 8 para recuperar la R4.

Se recuperó la sección como se describió anteriormente, se obtuvo un peso total de 25 mg para el R4.

7.23.6 Actividad antimicrobiana de las Regiones activas por difusión de pozo en agar

Se evaluó la actividad antimicrobiana en contra de *A. baumannii*, para cada una de las regiones. El contenido en cada vial fue resuspendido en 3 mL de metanol y se colocaron 200 μ L por pozo para su evaluación. Las cantidades de cada región evaluadas

oscilaron entre los 2 a 4 mg por región, en la Figura 53 se observan los halos de inhibición obtenidos para cada región activa.

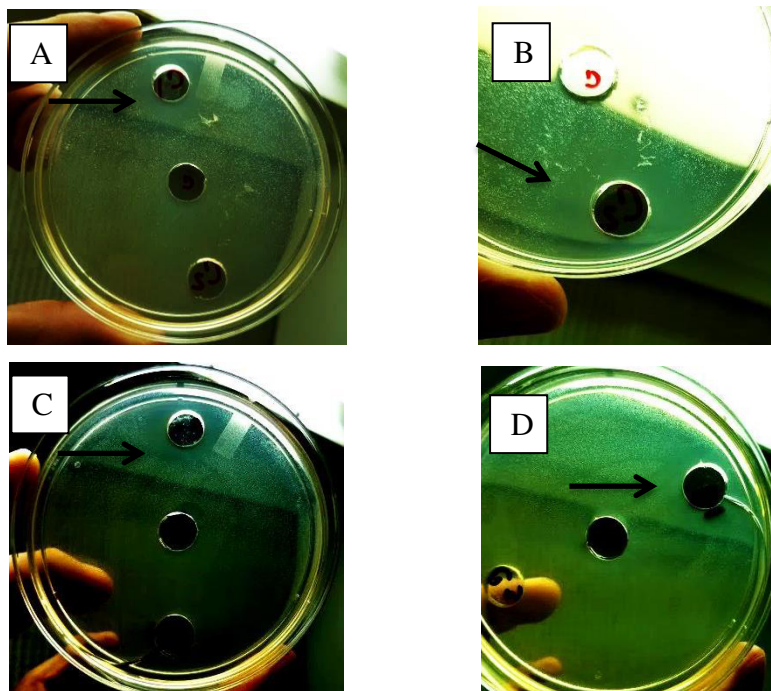


Figura 53. Actividad antimicrobiana para las regiones activas de *N. bivalve*; A) R1, B) R2, C) R3 y D) R4.

7.23.7 Análisis por FT-IR de las regiones seleccionadas

Se llevó a cabo un análisis por FT-IR de las diferentes Regiones Activas (Figuras 54 a la 57), obteniéndose lo siguiente:

Para R1:

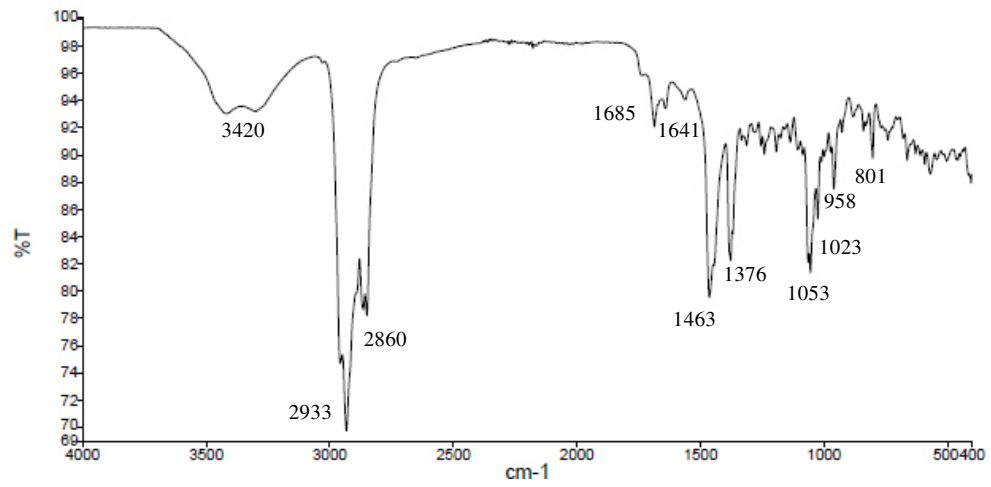


Figura 54. Análisis por FT-IR para la región 1 activa de *N. bivalve*.

Para R2:

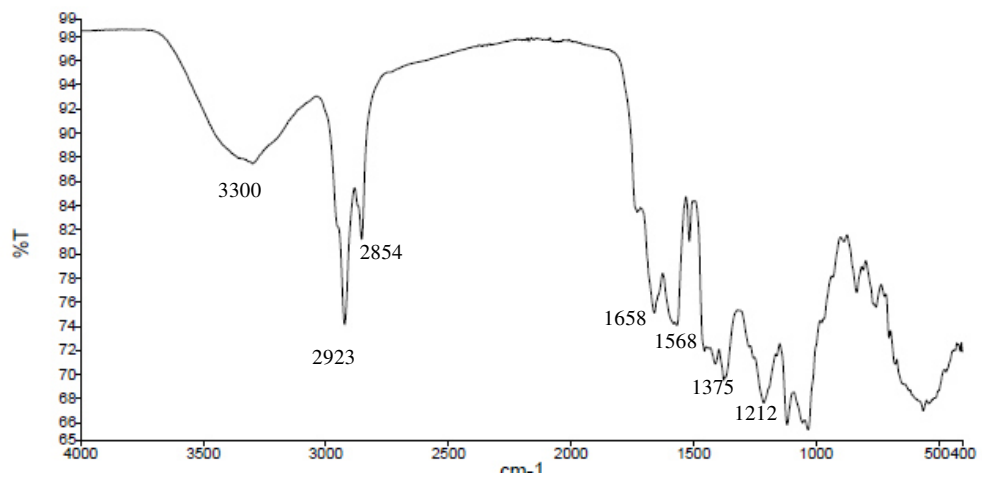


Figura 55. Análisis por FT-IR para la región 2 activa de *N. bivalve*.

Para R3:

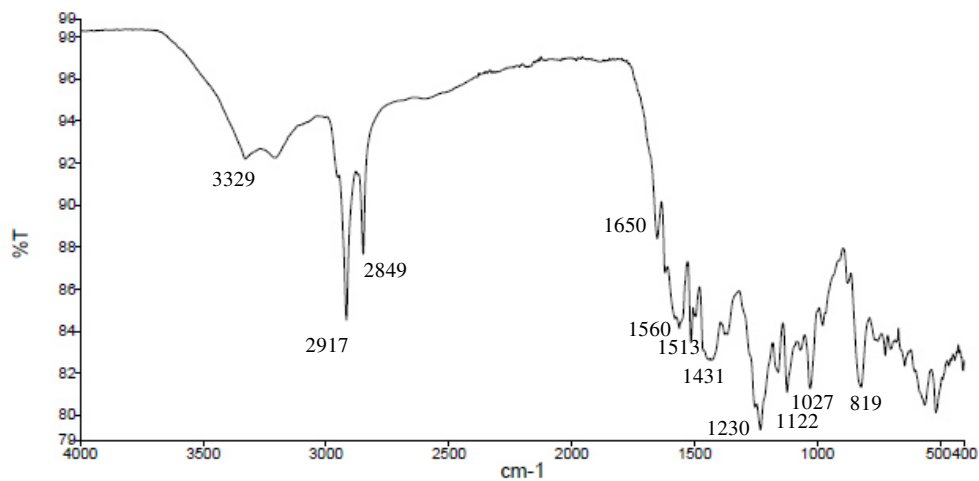


Figura 56. Análisis por FT-IR para la región 3 activa de *N. bivalve*.

Para R4:

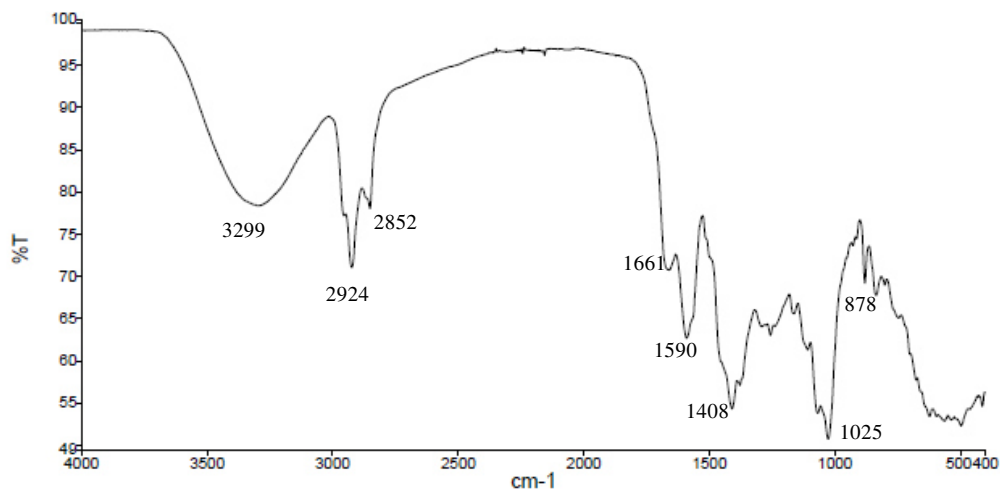


Figura 57. Análisis por FT-IR para la región 4 activa de *N. bivalve*.

Se observa similitud entre los espectros obtenidos para las 4 regiones activas. Entre ellas destacan las señales de: entre 3,420-3,299 (OH ó C=NH), dos picos de entre 2,860-2,849 y 2,933-2,917 (CH₂ ó CH₃), picos entre 1,685-1,560 (-NH₂ ó C=C), picos entre 1230 y 958 (C-C), lo que podría indicar la presencia de amidas o aminas.

8. DISCUSIÓN:

En los últimos años, *Acinetobacter baumannii* ha sido uno de los principales patógenos causantes de infecciones intrahospitalarias en todo el mundo, debido al aumento de su resistencia hacia los antibióticos convencionales y la su prevalencia en unidades de cuidados intensivos; este microorganismo pertenece al grupo de patógenos emergentes conocidos como ESKAPE. En el estado de Nuevo León, México, *A. baumannii* fue el microorganismo con mayor frecuencia en los aislados del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González durante los años 2011 y 2012 (Llaca-Días *et al.*, 2012; Gónzalez-Villoria y Valverde-Garduno, 2016).

Con respecto a los diferentes tipo de extractos que se realizaron en la presente investigación se encontró que los extractos metanólicos presentaron los rendimientos de extracción más altos para ambas plantas. En este sentido, se ha reportado que el metanol se utiliza con frecuencia para realizar extractos de plantas, porque permite la extracción de un mayor número de metabolitos de las plantas. Sin embargo, la extracción por maceración fue más eficiente que la extracción tipo Soxhlet (SE); esto debido a que las extracciones sucesivas sobre el mismo material vegetal fueron llevadas a cabo sólo con metanol, y las extracciones tipo Soxhlet se realizaron de forma sucesiva con diferentes solventes en gradientes de polaridad (Pandey y Tripathi, 2014; Castillo *et al.*, 2011).

Por otro lado, las evaluaciones preliminares de la actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* muestran que, los extractos metanólicos de *Parthenium incanum* y *Nothosordum bivalve* presentaron mayor actividad. Se ha reportado que diferentes extractos, de la especie de *Parthenium hysterophorus* muestran actividad antimicrobiana contra las cepas de *Streptococcus mutans*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhi* (Kumar *et al.*, 2014). En el caso de *Nothoscordum*, los extractos acuosos de los bulbos de en las *N. gracilipes* y *N. entrerianum* mostraron actividad contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Staphylococcus aureus*, así mimos el extracto acuso de *N. inodorum* afectó el crecimiento de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* (Lazo y Ravenna, 1989). Por otro lado, Sánchez *et al.*, (2016); reportaron que los extractos metanólicos de los bulbos

de *N. bivalve* no presentaron actividad antimicrobiana contra cepas fármaco resistentes de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Staphylococcus aureus*, todas ellas aisladas en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Lo anterior podría sugerir que, las extracciones acuosas en los bulbos de las especies pertenecientes al género *Nothoscordum* podrían contener metabolitos biológicamente activos, debido a que el agua extrae compuestos con una polaridad.

Las concentraciones mínimas bactericidas (CMB's) se obtuvieron sólo para extractos metanólicos debido a su mayor actividad; estos resultados oscilaron entre los 7.50 a 8.50 mg/mL. A ese respecto Raut *et al.* (2010) reportaron CMBs de extractos polares de *P. hysterophorus*, estando éstos entre 24 y los 72 mg/mL para *S. aureus*, *E. coli* y *Aspergillus fumigatus*. Sin embargo, para *Nothoscordum*, ninguna concentración mínima bactericida ha sido reportada previamente para algún microorganismo.

Los resultados para los extractos metanólicos de *P. incanum* y *N. bivalve* contra *Artemia salina*; presentaron diferentes grados de toxicidad (LD₅₀); *P. incanum* maceración con metanol presentó toxicidad moderada (380 µg/mL), y *P. incanum* Soxhlet con metanol fue relativamente inocuo (1882 µg/mL); por otra parte, *N. bivalve* maceración metanol fue ligeramente tóxico (916 µg/mL) y *N. bivalve* Soxhlet metanol fue prácticamente no tóxico (1023 µg/mL) según la clasificación de toxicidad de Sánchez *et al.*, (2005). Es común evaluar la toxicidad de los productos naturales con actividad biológica utilizando la prueba de *A. salina* debido a su facilidad de uso, bajo costo y confiabilidad (Solís *et al.*, 1993; Pérez-Hernández *et al.*, 2015). La diferencia entre el grado de toxicidad puede ser debida al tipo de solvente utilizado y al método de extracción; ya que el hexano y el cloroformo suelen utilizarse para eliminar compuestos no polares del material vegetal y solventes como el metanol y agua extraen los compuestos con mayor polaridad (Pandey y Tripathi, 2014; Azwanida, 2015; Dehghan *et al.*, 2016); esto explicaría la diferencia entre los extractos metanólicos utilizados de ambas plantas.

En las evaluaciones de citotoxicidad preliminar de los extractos metanólicos de *P. incanum* y *N. bivalve*, puede verse claramente que el extracto de *P. incanum* maceración metanol muestra aproximadamente 92,98% de hemólisis a 1000 µg/mL; a medida que aumenta la concentración de extracto, aumenta el porcentaje de hemólisis. Por el contrario, *P. incanum* Soxhlet metanol en todas las concentraciones evaluadas presentó entre 0.07 y 1.43% de hemólisis. El extracto de *N. bivalve* maceración metanol a 1000 µg/mL mostró 13.69% de hemólisis, mientras que el extracto de *N. bivalve* Soxhlet metanol en todas las concentraciones evaluadas causó entre 0.16 a 2.39% de hemólisis. Los extractos de maceración presentaron mayor hemólisis que los obtenidos por Soxhlet; esto puede ser debido al método de extracción aplicado sobre el material vegetal, sólo se utilizó metanol para la maceración, mientras que para el Soxhlet se utilizó un gradiente de polaridad creciente, extrayendo secuencialmente con diferentes disolventes. Por lo tanto diferentes solventes extraen diferentes metabolitos. Esto explica que los extractos metanólicos obtenidos después de un gradiente de polaridad (Soxhlet) difieran de los obtenidos por extracción sin tal gradiente (maceración) (Pandey y Tripathi, 2014; Castillo *et al.*, 2011). Se ha informado de que los extractos de plantas pueden contener compuestos citotóxicos, por lo que el análisis de hemólisis se utiliza como indicador general en el estudio de la citotoxicidad (Vinjamuri *et al.*, 2015; Lakshmi *et al.*, 2014; Araújo de Oliveira *et al.*, 2009). Nuestros resultados sugieren la presencia de compuestos citotóxicos (hemolíticos), en los extractos metanólicos llevados a cabo por maceración en ambas plantas, es sabido que los solventes como el hexano y cloroformo extraen metabolitos no polares como lípidos, pigmentos, terpenos, flavonoides; mientras que una extracción con metanol puede contener antocianinas, terpenoides, saponinas, taninos, lactonas, flavonas, fenoles y polifenoles (Pandey y Tripathi, 2014; Azwanida, 2015; Dehghan *et al.*, 2016), puede notarse una diferentes entre el tipo de metabolito obtenido para cada extracción.

Así mismo, se puede observar una correlación entre las pruebas de *A. salina* y hemólisis; el extracto de *P. incanum* maceración metanol presentó una menor LD₅₀ y un mayor grado de hemólisis, a diferencia de los otros extractos, que presentaron una mayor LD₅₀ y menores porcentajes de hemólisis.

Puede observarse que los extractos de maceración causaron baja o nula citoprotección (técnica AAPH); para *N. bivalve* no se observó actividad citoprotectora y para *P. incanum* a 500 µg/mL, se encontró una eficacia de aproximadamente 41,92%, sin embargo, cuando la concentración del extracto aumentó, la actividad cayó al 12,91%. Esto puede deberse a su capacidad hemolítica a esas concentraciones; cuando la concentración aumenta, presenta mayor grado de hemólisis. En el caso de los extractos obtenidos con Soxhlet, se observaron actividades citoprotectoras más altas; para los extractos de *P. incanum* a 500 y hasta 1000 µg/mL, se observó entre 86,95 a 94,58% de citoprotección, mientras que para *N. bivalve* la citoprotección fue proporcional al aumento de la concentración del extracto, mostrando a una 500 µg/mL un 5.85 % de citoprotección, 750 µg/mL un 39.24% y a 1000 µg/mL un 79.34%. La diferencia entre estos resultados podría deberse a los diferentes métodos de extracción utilizados, como ya se mencionó en el caso de hemólisis. Los radicales peróxidos del AAPH atacan la membrana eritrocitaria; por lo que los extractos de plantas evaluados en este ensayo podrían ser una alternativa en la prevención o tratamiento de la oxidación provocada por radicales libres. En estudios anteriores se ha observado que los extractos de plantas o sus compuestos naturales contrarrestan la acción de los radicales formados por AAPH (Sulaiman y Hussain, 2012; Benites *et al.*, 2012; Chisté *et al.*, 2014).

Los extractos mostraron una alta capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) (>200 µmol ET/g) en comparación con los observados en algunos alimentos (maíz de granos azules, harina de maíz azul comercial nixtamalizada, virutas comerciales de tortilla azucarada y mazorcas de maíz de huitlacoche); por otro lado, los valores obtenidos son menores (> 400 mM ET/g) en comparación con extractos de otras plantas (acuosos y etanólicos) de los géneros *Anacardium*, *Clausena*, *Litsea*, *Ocinum*, *Piper*, *Pseuderanthenum*, *Spondias* y *Syzygium* (Amador-Rodríguez *et al.*, 2015; Chanudom *et al.*, 2014). Por medio de las metodologías que utilizan los radicales DPPH y ABTS puede cuantificarse la cantidad equivalente de Trolox por cada gramo de muestra a evaluar; en los resultados obtenidos puede observarse que la cuantificación es muy similar por ambos métodos, pero utilizando ABTS para los extractos de *P. incanum*

fue cuantificada mayor cantidad de equivalentes de Trolox. En el caso de los extractos de *N. bivalve* se encontró mayor cantidad de equivalentes de Trolox por el radical DPPH. En el año 2011 (Floegel *et al.*) se llevó a cabo una comparación de las metodologías con los radicales DPPH y ABTS, en diversas frutas y verduras, demostrando que con el radical ABTS se obtienen mayor número de equivalentes de Trolox. Por otro lado, en 2013 (Fidrianny *et al.*) llevó a cabo la comparación de las mencionadas técnicas con diversos extractos de hojas de mango y obtuvo que con el radical DPPH mayor cantidad de equivalentes de Trolox.

El contenido de fenoles solubles se calculó como equivalentes de ácido gálico (EAG). Los extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* mostraron altos niveles de fenoles solubles que oscilaron entre los 1.348 ± 0.07 a 4.133 ± 0.04 EAG/100 g de extracto, siendo éstos superiores a los reportados previamente en los extractos acuosos y etanólicos de los géneros *Anacardium*, *Clausena*, *Litsea*, *Ocinum*, *Piper*, *Pseuderanthenum*, *Spondias* y *Syzygium* (Chanudom *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos se extraen con disolventes polares tales como el metanol; estos compuestos poseen diversas actividades biológicas tales como captación de radicales libres, actividad antimicrobiana y actividad antiviral, entre otros. Por lo tanto, siempre es útil correlacionar el contenido de fenoles solubles con la capacidad antioxidante de los extractos (Do *et al.*, 2014; Chanudom *et al.*, 2014; Piluzza y Bullitta, 2011). Los resultados muestran que los extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* no presentan una correlación entre capacidad antioxidante y fenoles solubles, ya que el extracto de *P. incanum* maceración metanol presenta alta capacidad antioxidante y bajo contenido de fenoles solubles en comparación al extracto proveniente de la extracción Soxhlet de la misma planta, esto puede ser debido a que la extracción para cuantificación de fenoles solubles fue con metanol al 30% y para el DPPH/ABTS con metanol absoluto.

Sólo se utilizaron extractos metanólicos de la extracción tipo Soxhlet para la inhibición de la formación de biopelículas, ya que mostraron baja toxicidad, citotoxicidad y efecto citoprotector significativo. Los resultados mostraron que ambos extractos afectan la formación de biopelículas en *A. baumannii* a concentraciones

subletales de sus CMB's. Para *P. incanum*, se observó una inhibición del 41.62% al 75% de su CMB. En el caso de *N. bivalve*, se observaron inhibiciones de 19.53, 40.78 y 35.98% a 25, 50 y 75% de su CMB, respectivamente. La formación de biopelículas es un mecanismo de virulencia utilizado por microorganismos para contrarrestar los antibióticos; hay informes sobre extractos de plantas que han inhibido la formación de esta defensa en *A. baumannii*. En el caso de los extractos hidroalcohólicos de hongos pertenecientes a los géneros *Russula*, *Fistulina*, *Mycena*, *Leucopaxilus* y *Lepista*, se encontró un porcentaje máximo de 28.59% de inhibición de la formación de biopelículas con concentraciones subletales de las CMB's (<20 mg/mL) (Alves *et al.*, 2014). Del mismo modo, extractos etanólicos de jengibre a concentraciones entre 0.625 a 80 mg/mL tuvieron un efecto inhibiendo significativamente la formación de biopelículas en *A. baumannii* (Aghazadeh *et al.*, 2016).

Los ensayos de TP (tiempo de protrombina) y TTPa (tiempo de tromboplastina parcial activada), realizaron sólo con los extractos metanólicos de provenientes del Soxhlet, donde se evaluaron concentraciones de 500 y 1000 µg/mL. Los resultados de TP y TTPa para el extracto de *P. incanum* mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a las otras medias, incluyendo los controles. Por otro lado, en las pruebas de TTPa, no se encontraron diferencias significativas entre las medias ($p > 0,05$), incluyendo los controles. En los últimos años, se han realizado varios estudios de las actividades anticoagulantes en extractos de plantas, ya que se buscan nuevos principios activos para tratar las enfermedades trombóticas; se sabe que la prolongación del TP muestra inhibición en la vía extrínseca de la coagulación y, por otra parte, la prolongación del TTPa muestra inhibición en la vía intrínseca de la coagulación (Karim *et al.*, 2013; Félix-Silva *et al.*, 2014).

La presencia del gen *recA* fue utilizado para la identificación génica de la cepa en estudio. Así mismo la expresión de los genes de virulencia *ompA*, *bap*, *csuE* fueron un indicativo de la resistencia y capacidad del microorganismo para la formación de biopelícula; ya que las cepas que albergan estos rasgos presentan alta resistencia a los antibióticos y así como la capacidad de adhesión a superficies y formación de

biopelículas (Azizi *et al.*, 2016). Después de la cuantificación en la expresión de los genes *bap*, *csuE* con respecto al gen constitutivo (*recA*) por qPCR, se observó una ligera sobreexpresión de los mismos; el caso del gen *bap* la sobreexpresión puede deberse a una baja concentración de hierro (Azizi *et al.*, 2016) y para el caso de *csuE* se sugiere una presión selectiva por parte de los compuestos bioactivos del extracto, debido a un daño ya sea morfológico, funcional y/o molecular. Por otro lado, al evaluar el gen *abaI* que codifica al autoinductor AHL (Acil-homoserin lactona) en *A. baumannii*, el cual es el encargado del sistema de comunicación intercelular (*quorum sensing*) para la formación de biopelículas, mostró una alta sobre expresión génica. Con respecto a esto, se ha demostrado que los antibióticos (levofloxacino y meropenem) inducen la sobre expresión de las bombas efflux AdeFGH, lo que causa un aumento en la densidad de AHL en el entorno extra celular acelerando la entrada de AHL al entorno intracelular; esto en dos diferentes cepas de *A. baumannii*, aisladas en un hospital en China (He *et al.*, 2015). Esto podría indicar que el extracto contiene moléculas cuya función es similar a la de los antibióticos antes mencionados

Al observar la interacción de la cepa con el extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH bajo microscopía electrónica de barrido, logró apreciarse que al 75% de su CMB (5.61 mg/mL) causa daños en la estabilidad de la biopelícula y cambios en la morfología del microorganismo. Tenseg *et al.*, (2016) evaluaron la concentración de 20 μ M del compuesto 5-episinuleptolide aislado del coral *Sinularia leptoclados*, encontrando que afecta de manera significativa la estabilidad de la biopelícula de una cepa de *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), al ser analizada por microscopía electrónica de barrido; así mismo mencionan que la expresión del gen *bap* no se vio afectada por dicho compuesto al ser evaluado por qPCR. Por otro lado, la fracción de acetato de etilo del extracto de *Pericarpium trichosanthis* a una concentración de 1/4 de su CMB (1.5 mg/mL) causó un daño en la morfología de una cepa de *A. baumannii*, sugiriendo que los componentes de dicho extracto generan daños destructivos, ya que éstos pueden causar una pérdida estructural sobre la membrana celular o causar un daño en las proteínas de membrana, lo cual desencadenaría la destrucción de la pared celular y por

lo tanto la muerte celular (Yang *et al.*, 2009); lo anterior podría explicar el efecto del extracto de *N. bivalve* sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii*.

Las células PBMC (células normales) son utilizadas con frecuencia como modelo de citotoxicidad en la investigación de productos naturales; así mismo son utilizadas para evaluar el efecto de un extracto o compuesto sobre la proliferación celular, con el fin de descubrir nuevos inmunomoduladores (Yeap *et al.*, 2007, Ampasavate *et al.*, 2010). Para la evaluación de la citotoxicidad en células PBMC's, el extracto de *N. bivalve* MeOH Soxhlet presentó a las concentraciones evaluadas (100, 250 y 500 µg/mL), el 100 % de viabilidad celular, con respecto a los controles; demostrando que el extracto de *N. bivalve* no causa citotoxicidad y no afecta la proliferación en las células mononucleares de sangre periférica.

Por otro lado, se realizó la inhibición de una enzima hidrolizante de carbohidratos, la α -glucosidasa, lo cual retarda la absorción de glucosa, este tipo de ensayos se llevan a cabo ya que la inhibición de esta enzima es considerada como una alternativa para los pacientes que padecen *diabetes mellitus* (Kumar *et al.*, 2011). Nuestros resultados indican que el extracto de *N. bivalve* puede ser considerado con un potencial inhibidor de la α -glucosidasa, ya que su CI_{50} fue de 1393 ± 13 ppm. A este respecto, se han utilizado diversas plantas para lograr inhibir a dichas enzimas, entre ellas se ha observado que las IC_{50} obtenidas, oscilan entre los 10,000 y 0.66 ppm (Sulistiyan *et al.*, 2016)

Además se evaluó, la capacidad antiurolítica del extracto de *Nothoscordum bivalve* Soxhlet MeOH, donde se encontró que dicho extracto es capaz de inhibir la formación de cristales de oxalato, dicho extracto mostrando una CI_{50} de 1141 ± 30 ppm en contraste al control positivo que fue de aproximadamente 2500 ppm (CI_{50} de $C_6H_5K_3O_7$). Los estudios para inhibir la nucleación de los cristales de oxalato por parte de Pérez-Hernández *et al.*, (2015), mostraron que el extracto metanólico de *Berberis trifoliata* presenta una inhibición del 93% a una concentración de 1000 ppm. El extracto de *N. bivalve* Soxhlet MeOH presentó una baja actividad para inhibir la nucleación de los cristales de oxalato, en comparación del extracto metanólico de *B. trifoliata*, ya que se

necesitarían más de 2000 ppm para causar efecto con el extracto en estudio. Por otro lado, en comparación del control positivo se observa que la planta podría contener compuestos con actividad antiulcerosa, dando esto la pauta a seguir realizando estudios con otros extractos, fracciones o compuestos de *N. bivalve*.

Con respecto a los compuestos aislados e identificados para la especie *Parthenium incanum*; el análisis fitoquímico cualitativo del extracto mostró la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenos, taninos y carbohidratos al igual que el extracto metanólico de las hojas de *P. hysterophorus* obtenido por Sinha & Paul (2014). El fraccionamiento por cromatografía en columna y la posterior comparación de las fracciones obtenidas por TLC permite obtener alguna región específica y/o compuesto de la planta en estudio, (Ibarra *et al.*, 2011); estas técnicas cromatográficas ofrecen una visión general de la abundancia y polaridad de los componentes de la muestra analizada (Yamin *et al.*, 2016). Esta es la razón por la cual el fraccionamiento y la comparación de las fracciones se llevaron a cabo, para mezclar las fracciones obtenidas similares y asegurar una mayor concentración. El alto potencial antimicrobiano de la partenina se ha demostrado anteriormente (Siddhardha *et al.*, 2012), por lo que esta capacidad se utilizó como un indicador biológico en la búsqueda de fracciones activas. Dichas fracciones que mostraban actividad antimicrobiana presentaron una banda azul-violeta característica de la partenina (R_f aproximadamente de 0.6) (Hernández *et al.*, 2011). Por medio de una PTLC, fue posible recuperar el compuesto; esto se llevó a cabo debido a que esta metodología se usa para aislar algunos compuestos de interés, como en el caso de Guitierrez *et al.* (2009), que llevaron a cabo lo anterior para aislar los esteroides de la especie *Lipidium meyenii* Walp. El análisis FT-IR mostró señales de 3396 cm^{-1} (OH), 2924 cm^{-1} y 2854 cm^{-1} (CH en alcanos), 1707 cm^{-1} (C=C en alquenos), 1377 (vibración OH) y 1104 cm^{-1} (C=O del anillo de lactona). Las señales identificadas son similares a las obtenidas por Basarkar *et al.* (2013), en el aislamiento de la partenina de los granos de polen pertenecientes a *P. hysterophorus*. Los análisis HPLC-MS mostraron la presencia de los pseudoiones moleculares de 263 y 265 m/z correspondientes a partenina y coronopolina respectivamente en ambas muestras. Se sabe que el peso molecular de la partenina es de $262,32\text{ g/mol}$, mientras que la coronopolina tiene un peso molecular de

264,32 g / mol (Roy y Shanik, 2013); los valores de los pseudo iones moleculares en el análisis se deben al uso de ionización por electro-pulverización en modo positivo $[M+H]^+$ (Hernández *et al.*, 2011; Niranjana *et al.*, 2012). Al analizar los compuestos en ambos tipos de extracción se puede observar que para la ionización del pseudo ión molecular correspondiente a la partenina (263 m/z) se presenta los fragmentos 245 $[M+H-18]^+$, 227 $[M+H-36]^+$, 209 $[M+H-54]^+$, 199 $[M+H-64]^+$, 181 $[M+H-82]^+$ y 149 m / z $[M+H-114]^+$; que han sido reportados por Niranjana *et al.*, (2012), para la fragmentación de la partenina por electro spray en modo positivo para el caso del pseudo ión molecular de la coronopolina (265 m/z), muestran los fragmentos 247 $[M+H-18]^+$, 229 $[M+H-36]^+$, 219 $[M+H-46]^+$, 205 $[M+H-60]^+$, 201 $[M+H-64]^+$, 187 $[M+H-78]^+$, 173 $[M+H-92]^+$, 159 $[M+H-106]^+$ y 139 $[M+H-126]^+$.

Con respecto a los compuestos aislados e identificados para la especie *Nothoscordum bivalve*; el análisis fitoquímico cualitativo del extracto mostró la presencia de esteroides y triterpenos, cumarinas, alcaloides, taninos, carbohidratos y flavonoides; resultados similares fueron reportados por Sihdu &Thakur (2016), en extractos acuosos y etanólicos de las hojas y bulbos de *Nothoscordum gracile*, donde observaron la presencia de carbohidratos, gomas, mucilagos, saponinas, taninos y terpenoides en los extractos acuosos y para aquellos extractos llevados a cabo con etanol se observó la presencia de alcaloides, carbohidratos, flavonoides, glucósidos, azúcar reductores, esteroides, taninos y terpenoides. Entre los metabolitos secundarios similares detectados entre las partes áreas de ambas especies, destacan los flavonoides, carbohidratos, taninos y alcaloides. Las señales obtenidas por los análisis de FT-IR de las 4 regiones activas de *N. bivalve*, demuestran gran similitud a las obtenidas por Sihdu &Thakur (2016) en los análisis por FT-IR de la muestra pulverizada de las hojas de *N. gracile* mostraron las señales de 3275.50 cm^{-1} (N-H en aminos y amidas), 2917.35 y 2847.72 cm^{-1} (O-H ácidos carboxílicos), 1654.17 cm^{-1} (C=C en alquenos), 1586.23 cm^{-1} y 1559.75 cm^{-1} (N-H en aminos y amidas), 1459.54 N-H cm^{-1} y 1364.77 cm^{-1} (estiramiento C-H y C-N respectivamente), 1237.80 cm^{-1} , 1102.96 cm^{-1} , 1011.55 cm^{-1} (estos tres picos han sido reportados para el enlace C-O en alcoholes, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y anhídridos), 529.97 cm^{-1} (presencia del anión pentaborato) y la

señal 430.32 cm^{-1} estiramiento de S-S en disulfuro de arilo. En las señales obtenidas por FT-IR de las 4 regiones activas destacan entre 3420-3299 (OH ó N-H), dos picos de entre 2933-2917 y 2860-2849 (CH_2 , CH_3 o O-H de ácidos carboxílicos), picos entre 1685-1560 ($-\text{NH}_2$ ó $\text{C}=\text{C}$), picos entre 1230 y 958 (C-C), estas señales podrían indicar la presencia de amidas o aminas, como compuestos responsables de la actividad biológica.

9. CONCLUSIONES

- Los diferentes extractos de *P. incanum* y *N. bivalve* mostraron diversas actividades biológicas tales como actividad antimicrobiana, antioxidante, citoprotectora, toxicidad, citotoxicidad, inhibición en la formación de biopelículas, actividad anticoagulante, inhibición de genes de virulencia, actividad antiurolítica, e inhibidora de la α -glucosidasa.
- Los extractos metanólicos provenientes del Soxhlet presentaron baja toxicidad y citotoxicidad, además de ser citoprotectores de eritrocitos humanos e inhibieron la formación de biopelículas por *A. baumannii*.
- El extracto metanólico de *N. bivalve* es fuente de metabolitos secundarios con actividad antibiopelícula en contra de *A. baumannii*. Los compuestos activos causaron un daño en la estabilidad y mantenimiento de su biopelícula, así como en la morfología. Dichos compuestos indujeron una ligera sobreexpresión en los genes *bap* y *csuE*, mientras que provocaron una marcada sobreexpresión del autoinductor *abaI* (*quorum sensing*).
- El potencial antiurolítico y antidiabético de la planta *N. bivalve* fue demostrado por técnicas *in vitro*, dando la pauta a futuras investigaciones, esto debido a su baja toxicidad y citotoxicidad.
- La partenina y la coronopolina fueron identificados por técnicas cromatográficas y espectrométricas en los extractos por maceración y tipo Soxhlet en *Parthenium incanum*.
- Las aminas o amidas pueden ser los compuestos responsables de la actividad biológica en *N. bivalve*.

10. PERSPECTIVAS

Llevar a cabo, los análisis correspondientes de las regiones activas de *N. bivalve* por HPLC-MS, para identificar a los compuestos responsables de la actividad biológica.

Así mismo, con los resultados obtenidos, se demuestra el gran potencial benéfico de las plantas *Parthenium incanum* y *Nothoscordum bivalve*. El siguiente paso, en la investigación de éstas plantas sería una evaluación *in vivo* de su toxicidad en modelo murino, analizando el daño renal y hepático que podrían causar determinadas concentraciones en cada individuo. Esto con la finalidad de evaluar posteriormente el potencial antimicrobiano, antihiper glucemiante, antiutolítico y anticoagulante en animales de laboratorio.

Por otro lado, llevar a cabo estudios como los antes mencionados con sus compuestos aislados ya que esto permitirá conocer aún más el alcance y beneficio de dichas plantas, ya que podrían ser fuente de posibles compuestos farmacológicos con una marcada actividad biológica, que podrían ser parte de la prevención o tratamiento de algunas enfermedades.

11. BILIOGRAFÍA

1. Aghazadeh M, Zahedi Bialvaei A, Aghazadeh M, Kabiri F, Saliari N, Yousefi M, Eslami H, Samadi Kafil H. 2016. Survey of the antibiofilm and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* (*in vitro* study). *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(2), 1-6.
2. Al Sehlawi Zuhair Sadiq, Almohana Ali Muhsin, Al-Thahab. AA. 2014. Isolation and identification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates using novel methods. *Journal of Babylon University*. 3 (22).
3. Alamgeer RQ &Hira A. 2017. Effect of crude extract of *Grewia asiatica* L. on lipid profile and coagulation parameters of rats and mice. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 16(2): 216-220.
4. Alves MJ, Ferreira IC, Lourenço I, Costa E, Martins A, Pintado M. 2014. Wild mushroom extracts as inhibitors of bacterial biofilm formation. *Pathogens*. 3(3): 667-679.
5. Amador-Rodríguez KY, Martínez-Bustos F, Pérez-Cabrera LE, Posadas-del-Río FA, Chávez-Vela NA, Sandoval-Cardoso ML, Guevara-Lara F. 2015. Effect of huitlacoche (*Ustilago maydis* DC Corda) paste addition on functional, chemical and textural properties of tortilla chips. *Food Science and Technology (Campinas)*. 35, 452-459.
6. Ampasavate, C., Okonogi, S. and Anuchapreeda S. 2010. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4 (1): 13-21.

7. Apechea M, Fano R, Garrido M. Efecto *in vitro* de un extracto acuoso de las hojas de *Ricinus communis* sobre la formación del coágulo sanguíneo. Rev Cubana Plant Med 1998;3(2):62-63.
8. Araújo de Oliveira VM, Basilio-Carneiro AL, de Barros-Cauper GS, Pohlit AM. 2009. *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amazonica*, 39(4), 973-980.
9. Azwanida NN. 2015. A Review on the Extraction Methods Used in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*. 4:196.
10. Azizi, O., Shahcheraghi, F., Salimizand, H., Modarresi, F., Shakibaie, M. R., Mansouri, S., Ramazanzadeh R, Badmasti F y Nikbin, V. (2016). Molecular analysis and expression of *bap* gene in biofilm-forming multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 5(1), 62-72.
11. Balaich JN, Mathias DK, Torto B, Jackson BT, Tao D, Ebrahimi B, Tarimo BB, Cheseto X, Foster W & Dinglasan RR. (2016). The nonartemisinin sesquiterpene lactones parthenin and parthenolide block *plasmodium falciparum* sexual stage transmission. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* .60(4):2108-2117.
12. Basarkar UG, Saoji AA. 2013. Isolation, characterization of sesquiterpene parthenin and its estimation from *Parthenium hysterophorus* pollen. *International Journal of Emerging Technologies in Computational and Applied Sciences*. 5(4):364-368.
13. Beceiro A., Tomás M. & Bou G. 2012. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 30(8):492-499.

14. Belz RG. 2008. Stimulation versus inhibition-bioactivity of Parthenin, a phytochemical from *Parthenium hysterophorus* L. *Dose-Response*. 6(1):80-96.
15. Benites J, Gutierrez E, López J, Rojas M, Rojo L, Costa MC, Vinardell MP, Calderon PB. 2012. Evaluation of analgesic activities of tremetone derivatives isolated from the Chilean altiplano medicine *Parastrephia lepidophylla*. *Natural products communications*, 7(5), 611-614.
16. Betancourth M. Botero J & Rivera S. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*. 35(3):34-39.
17. Cardoso CL, Silva HS, Castro-Gamboa I, Bolzani VS. 2005. New biflavonoid and other flavonoids from the leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 16:1353-1359.
18. Caroch M, Ferreira I. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51:15-25.
19. Castillo SL, Heredia N, Contreras JF, García S. 2011. Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Food Science*. 76(6):M421-M426.
20. Castro-Jaimes S, Salgado-Camargo AD, Graña-Miraglia L, Lozano L, Bocanegra-Ibarias P, Volkow-Fernández P, Castillo-Ramirez S y Cevallos MA. 2016. Complete genome sequence of a multidrug-resistant *acinetobacter baumannii* isolate obtained from a Mexican hospital (sequence type 422). *Genome Announcements*, 4(3), e00583–16.

21. Chatterjee S, Asakura M, Chowdhury N, Basu S, Sugimoto N, Haldar S, Awasthi S, Hinenoya A, Yamasaki S & Aoki S. 2010. Capsaicin, a potential inhibitor of cholera toxin production in *Vibrio cholerae*. FEMS Microbiol Lett. 306:54-60.
22. Chisté RC, Freitas M, Mercadante AZ, Fernandes E. 2014. Carotenoids are effective inhibitors of *in vitro* hemolysis of human erythrocytes, as determined by a practical and optimized cellular antioxidant assay. Journal Food Science, 79(9), 1841-1847.
23. Choma I & Grzelak E. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A. 1218: 2684-2691.
24. Chanudom L, Bhoopong P, Khwanchuea R, Tangpong J. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous & ethanol crude extracts of 13 Thai traditional plants. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(1), 549-558.
25. Constantiniu S, Romaniuc A, Smaranda L, Filimon R, Tarai I. 2004. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. strains isolated from hospital units. The journal of preventive medicine; 12 (3-4): 35-42.
26. Datta S, Saxena DB. 2001. Pesticidal properties of parthenin (from *Parthenium hysterophorus*) and related compounds. Pest Management Science. 57:95-101.
27. Dehghan H, Sarrafi Y y Salehi P. 2016. Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. Journal of Food and Drug Analysis. 24(1):179-188.
28. Díaz V. 2010. *Acinetobacter baumannii*: actualidades. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 23(92):104-105.

29. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju Y-H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22(3), 296-302.
30. Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa. México. pp 40-43.
31. Dorman HJD & Hiltunen R. 2004. Fe (III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food chemistry*. 88:193-199.
32. Dortet L, Legrand P, Soussy C-J, Cattoir V. 2006. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (12):4471-4478.
33. Ebadi M. Pharmacodynamic basis of herbal medicine. 2006. Second Edition. CRC Press. Health&Fitness. 699 pages.
34. Félix-Silva J, Souza T, Gomes-Camara RB, Cabral B, Silva-Júnior AA, Rebecchi IM, Zucolotto SM, Oliveira-Rocha HA, Fernandes-Pedrosa M de F. (2014) *In vitro* anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(405), 1-13.
35. Feresin GE, Tapia A, Gimenez A, Ravelo AG, Zacchino S, Sortino M, Schmeda-Hirschmann, G. 2003. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 89:73-80.

36. Floegel A, Kim D, Chung S, Koo SI, Chun OK. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, Campinas. 24:1043–1048.
37. Fidrianny I, Ira R, Komar RW. 2013. Antioxidant capacities from various leaves extracts of four varieties mangoes using DPPH, ABTS assays and correlation with total phenolic, flavonoid, carotenoid. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4), 189-194.
38. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells . *Infection and Immunity*. 277(8):3150-3160.
39. Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno V. 2016. Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen. *Journal of Pathogens*. 1-10.
40. Gutiérrez A DM, Bah M, Garduño R ML, Mendoza D SO, Serrano C V. 2014. Anti-inflammatory and antioxidant activities of methanol extracts and alkaloids fractions of four Mexican Medicinal Plants of Solanacea. *African Journal of Traditional Complementary, and Alternative Medicines*. 11(3):259-267.
41. Gutiérrez J, Montaña K, Bracho J, Rodríguez C y Chang A. 2009. Caracterización de esteroides en la fracción lipídica de la maca (walp.) mediante técnicas cromatográficas. *Rev Soc Quím Perú*. 75(2):254.
42. He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J, Cheng H, Cao J, Lu G. 2015. Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is

associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4817–4825.

43. Hasan S, Danishuddin M, Khan AU. 2015. Inhibitory effect of *Zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: *in vitro* and *in vivo* studies. *BCM Microbiology*, 15(1), 1-14.
44. Hernández D. 2015. Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana contra microorganismos farmacorresistentes del grupo ESKAPE. Tesis (Maestría en Ciencias). Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. p 20.
45. Hernández YS, Sánchez LB, Bedia MMG, Gómez LT, Rodríguez EJ, Miguel HMGS, Mosquera DG, García LP, Dhooche L, Theunis M, Pieters L, Apers S. 2011. Determination of parthenin in *Parthenium hysterophorus* L. by means of HPLC-UV: Method development and validation. *Phytochemistry* 4:134-137.
46. Howard TM. 2001. Bulbs for warm climates. First Edition, University of Texas, Austin, 35-36.
47. Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman MA, Ahmad IZ & Saeed M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 4(1):10–20.
48. Ibarra E, Pacheco M, García R, San Miguel R, Ramírez G y Soto M. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34(4):241-246.
49. Iqbal E, Salim KA, Lim LB. 2015. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy

Shaw) from Brunei Darussalam. Journal of King Saud University – Science. 27, 224.

50. Indrianingsih AW, Tachibana S, Dewi RT, Itoh K. 2015. Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 5(9): 748-755.
51. Irchhaiya R, Kumar A, Yadav A, Gupta N, Kumar S, Gupta N, Kumar S, Yadav V, Prakash A y Gurjar H. (2014). Metabolites in plants and its classification. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 4(1):287-305.
52. Japoni A, Sofian M, Van Belkum A. & Ghaznavi E. 2013. Nosocomial outbreak of extensively and pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in tertiary hospital in central part of Iran. Jundishapur J Microbiol. 6(8):1-5.
53. Jimenez I, Speisky H. 2000. Biological disposition of boldine: *in vitro* and *in vivo* studies. Phytother Res. 14(4):254–260.
54. Kane CW. (2006) Herbal medicine of the American Southwest: A guide to the identification, collection, preparation and use of medicinal and edible plants of the Southwestern United States. Lincoln Town Press, 163-164.
55. Kang M, Oh J, Kang I, Hong S, Choi C. 2008. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *The Journal of Microbiology*.46:744-750.
56. Karim MAA, Noor SM, Seman Z, Tohit ERM, Idris F. 2013. Evaluation of anticoagulant property of aqueous and ethanolic extracts of *Morinda citrifolia*. International Journal of Tropical Medicine, 8(1), 1-5.

57. Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. 2011. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*. 5(9):19-29.
58. Kumar S, Pandey S, Pandey AK. 2014. *In vitro* antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of *Parthenium hysterophorus* and characterization of extracts by LC-MS analysis. *BioMed Research International*, 1, 1-10.
59. Lakshmi G, Smitha N, Ammus SV, Priya CL, Bhaskara-Rao KV. 2014. Phytochemical profile, *in vitro* antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nouchali linn*: an *in vitro* study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 548-552.
60. Lazo W, Ravenna P. 1989. Antimicrobial activity of three species of the genus *Nothoscordum* (Alliaceae). *Boletín Micológico*, 4(2), 91-92.
61. Lee HW, Koh YM, Kim J. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(1):49–54.
62. Lee JH, Kim, YG, Ryu SY, Cho MH, Lee J. 2014. Ginkgolic acids and Ginkgo biloba extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *International Journal of Food Microbiology*. 174:47–55.
63. Llaca-Díaz JM, Mendoza-Olazarán S, Camacho-Ortíz A, Flores S, Garza-González E. 2012. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, México. *Chemotherapy*. 58(6):475-481.
64. Majouli K, Hlila MB, Hamdi A, Flamini G, Jannet H. Ben y Kenani A. 2015. Antioxidant activity and α -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.). *Industrial Crops & Products*. 82:23-28.

65. Marcano D. & Hasegawa M. 2002. Fitoquímica orgánica. Segunda Edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad de Venezuela. p 57.
66. Marwah RG, Fatope MO, Mahrooqi RA, Varma GB, Abadi HA, Khamis S, Burtamani Al. 2007. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Food Chemistry. 101:465:470.
67. Mathabe MC, Nikolova RV, Lall N & Nyazema NZ. 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. Journal of Ethnopharmacology.105:286293.
68. Meyer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Nichols DE. & McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Médica 45(3):1-34.
69. Mesa AM, Rincón D, Toro JF, Tamayo A, Blair S, Rojano BA. 2011. Actividad antioxidante de *Piper piedecuestanum* Trel. & Yunck. y *Piper subpedale* Trel. & Yunck. *Revista latinoamericana de química*, 39(3), 91-99.
70. Miyasaki Y, Rabenstein JD, Rhea J, Crouch M-L, Mocek UM, Kittell PE, et al. 2013. Isolation and characterization of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE 8(4): e61594.
71. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. 2015. The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(8), 1-7.
72. Morales-Meza MG y Ruiz de Chávez-Ramos CG. 2006. Diferencias en la resistencia a los antimicrobianos de cepas *Staphylococcus aureus* obtenidas de

diversas fuentes de aislamiento. Universidad La Salle. Rev. del Centro de Investigación. 25(7):45-64.

73. Namdeo AG. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Review*.1:69–79.
74. Nigjeh ES, Yusoff FM, Alitheen MNB, Rasoli M, Keong YS, Omar AR. 2013. Cytotoxic effect of ethanol extract of microalga, *Chaetoceros calcitrans*, and its mechanisms in inducing apoptosis in human breast cancer cell line. *BioMed Research International* 2013:783690.
75. Niranjana A, Mishra S, Lehri A, Amla DV, Upadhyay RS, Nautiyal CS. 2012. Identification and quantification of heterologous compounds parthenin and organic acids in *Parthenium hysterophorus* L. using HPLC-PDA-MS-MS. *Anal. Lett.* 46:48-59.
76. Pandey A y Tripathi S. 2014. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. 2(5):115-119.
77. Pérez-Hernández RA, Leos-Rivas C, Oranday-Cárdenas A, Hernández Luna CE, Sánchez-García E, Rivas-Morales C. 2015 Efecto *in vitro* en la inhibición del proceso de nucleación en litiasis renal, capacidad de captura de radicales libres, actividad antimicrobiana y tóxica del extracto metanólico de *Berberis trifoliata*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(1), 70-76.
78. Piluzza G, Bullitta S. 2011. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary uses in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*, 49, 240-247.

79. Ramos A, Rivero R, Visozo A, Piloto J, García A. 2002. Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 514:19-27.
80. Ravishankar S, Zhu L, Law B, Joens L & Friedman M. 2008. Plant-derived compounds inactivate antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Food Protection*. 71(6):1145-1149.
81. Raut SV, Pukale PS. 2010. Study on antimicrobials principles of *Parthenium hysterophorus* and its application as a disinfectant. *Plant Archives*, 10 (2), 919-926.
82. Richardson A, King K. 2011. *Plants of deep South Texas: A field guide to the wood and flowering species*. First Edition, College Station: Texas A&M University Press, 24.
83. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. 2016. *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience. 430 pp.
84. Rodríguez-Chanfrau JE, Fuentes L, Pardo-Ruiz Z, Garma M. 2003. Estabilidad de extractos fluidos al 70% de *Cymbopogon citratus*. *Revista Cubana Planta Médica*. 8(2):1-5.
85. Rocha R, Lozano P & Martínez Y. 2004. Mecanismos de Patogenicidad e Interacción parásito-hospedero. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. p 28-40.
86. Roy DC & Shaik Md Munan. 2013. Toxicology, phytochemistry, bioactive compounds and pharmacology of *Parthenium hysterophorus*. 1(3):126-141.

87. Sánchez CJ, Mende K, Beckius, ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*.13, 47.
88. Sánchez E, Heredia N, Camacho-Corona MR y García S. 2013. Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*. 115:1306-1317.
89. Sánchez E, Heredia N, García S. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20):6888-6894.
90. Sánchez E, Rivas Morales C, Castillo S, Leos-Rivas C, García-Becerra L, Mizael Ortiz Martínez D. 2016. Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. *J Evid Based Complementary Altern Med*. Article ID 1572697; 2016:8.
91. Sánchez L y Neira A. 2005. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. *Sw Cultura Científica*. 0(3):40-45.
92. Santiago G, Alberto L, Assunção M, Vasconcelos de Oliveira A, Conceição M & Azevedo E. 2013. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *The Scientific World Journal*. Article ID 862763. 8 pages.
93. Santos MG, Almeida VG, Avelar-Freitas BA, Graef CFF, Gregório LE, Pereira WF, Brito-Melo GEA. 2016. Phytochemical screening of the dichloromethane & ethanolic extract of *Eriosema campestre* var. macrophyllum roots and its

antiproliferative effect on human peripheral blood lymphocytes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Volume 26(4):464-470.

94. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 8: 1-10.
95. Shah WA. (2014). Phytochemical review profile of sesquiterpene lactone parthenin. *International Journal Research in Pharmacy and Chemistry*. 4(2):217-221.
96. Sharma P, Sharma JD. 2001. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *Journal Ethnopharmacology* 74(3):239–243.
97. Siddhardha B, Ramakrishna G & Basaveswara Rao MV. 2012. *In vitro* antibacterial efficacy of a sesquiterpene lactone, parthenin from *Parthenium hysterophorus* L (Compositae) against enteric bacterial pathogens. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* 2(3):206-209.
98. Sidhu MC, Thakur S. 2016. Phytochemical and elemental exploration of *Nothoscordum gracile* (Aiton) Stearn for its Medicinal Potential. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 9(4):2627-2631.
99. Sinha SN, Paul D. 2014. Antioxidant potentials of *Parthenium hysterophorus*.L leaf extracts. *Scientific Research Journal India*. 3(2):80-6.
100. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP & Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Médica*. 59:250-252.

101. Sotheeswaran S. 1988. Screening for saponins using the blood hemolysis test: An undergraduate laboratory experiment. *Journal of Chemical Education*. 65 (2), 161
102. Souza-Fagundes EM, Queiroz ABR, Filho OAM, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R, Alves TMA, Zani CL. 2002. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*. 97 (8): 1207-1212.
103. Souza L, Crosa O, Winge H, Guerra M. 2009. The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology*. 32(1):111-116.
104. Sulaiman AA, Hussain SA. 2012. Concentration and time dependent cytoprotective effects of anthocyanins against oxidative hemolysis induced by water and lipid soluble free radical initiators: an *in vitro* study. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 1(2), 133-140.
105. Sulistiyani, Safithri M, Puspita SY. 2016. Inhibition of α -glucosidase activity by ethanolic extract of *Melia azedarach* L. leaves. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 31. 012025.
106. Tseng SP, Hung WC, Huang CY, Lin YS, Chan MY, Lu PL, Lin L, Sheu JH. 2016. 5-Episinuleptolide decreases the expression of the extracellular matrix in early biofilm formation of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Marine Drugs*. 14(8).
107. Vahdani P, Yaghoubi T. & Aminzadeh Z. 2011. Hospital acquired antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a 400-bed hospital in Tehran, Iran. *International Journal of Preventive Medicine*. 2(3):127–130.

108. Valle D, Andrade J, Puzon J, Cabrera E & Rivera W. 2015. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(7):532–540.
109. Vinjamuri S, Shanker D, Ramesh RS, Nagarajan S. 2015 *In vitro* evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea Benth.* *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(7), 1263-1268.
110. Wagner, H. y Bladt, S. 2003. *Plant Drug Analysis*. Springer. Second Edition. p 125.
111. Wink M. 2011. *Phytochemistry and Pharmacognosy*. Chapter 3. Occurrence and Function of Natural Products in Plants. UNESCO-EOLSS. pp 1-10.
112. Xian-guo HE, Ursula M. 1994. Antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 43:173–17.
113. Yamin B, Abdul Q, Sobia N, Abdul W, Muhammad Fayyaz C. 2016. Isolation studies from stem extract of *Pistacia integerrima* Stew. Ex Brand. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 61(2):2916-2920.
114. Yang, JF, Yang CH, Chang HW, Yang CS, Lin CW, Chuang, LY. 2009. Antioxidant and antibacterial properties of *Pericarpium trichosanthis* against nosocomial drug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan, *Journal of Medicinal Plant Research*, 3(11), 982–991.

115. Yeap SK, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Raha AR, Suraini AA, Muhajir AH. 2007 Effect of *Rhaphidophora korthalsii* methanol extract on human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation and cytolytic activity toward HepG2. *Journal of Ethnopharmacology*. 114(3):406-411.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

David Alejandro Hernández Marín

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS *DE PARTHENIUM INCANUM* Y *NOTHOSCORDUM BIVALVE* CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Campo de estudio: Fitoquímica, Química de Productos Naturales y
Medicina Tradicional

Datos Personales: Nacido en Lagos de Moreno, Jalisco el 26 de Septiembre de 1987, hijo de Tomás Hernández Alcalá y Angelina Marín Torres.

Educación: Egresado como Lic. En Análisis Químico-Biológicos por la Universidad Autónoma de Aguascalientes, grado obtenido en el año 2012.

Egresado como M. en C por la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido en el año 2015.

Experiencia Profesional: Asistente en los laboratorios de Microbiología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes del año 2009 al 2012.
Asesor y colaborador en Proyectos de Investigación del año 2013 a la actualidad.