

**UNIVERSIDAD POPULAR
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
FACULTAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación antimicrobiana y genotóxica
de extractos vegetales utilizados en la
Sierra Negra, Puebla, México**

TESIS

Para obtener el título de:

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Guadalupe Velázquez Vázquez

Directora: Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Co-directora: Dra. Verónica Rodríguez Soria

AGOSTO 2021

Puebla, Puebla.



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

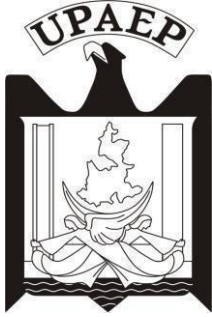
DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Decanato de Ciencias Biológicas Facultad de
Biotecnología
Doctorado en Biotecnología

Se aprueba la Tesis:

Evaluación antimicrobiana y genotóxica de extractos vegetales
utilizados en la Sierra Negra, Puebla, México

Nombre del Alumno:
Guadalupe Velázquez Vázquez

Comité de Asesores

Director(a) de Tesis
Dra. Beatriz Pérez Armendariz

Co-Director (a)
Dra. Verónica Rodríguez Soria

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez
Asesor(a)

Dra Laura Contreras Mioni
Asesor(a)

Dra. Anabella Handal Silva
Asesora externo

Puebla, México.

29 de noviembre de 2021

INDICE

RESUMEN	11
CAPÍTULO I	15
1. Introducción.....	16
1.2 Planteamiento del problema.....	18
1.3 Justificación.....	19
1.4 Objetivo general.....	20
1.4.1 Objetivos específicos	20
1.5 Hipótesis.....	21
1.5.1 Hipótesis alternativa	21
1.5.2 Hipótesis nula.....	21
1.6 Alcances y limitaciones	22
1.7 Estructura de la Tesis	24
CAPÍTULO II	25
2. Marco Teórico	26
2.1 Plantas medicinales	26
2.2 Extractos vegetales utilizados en la Sierra Negra de Puebla	28
2.2.1 <i>Ricinus communis</i>	28
2.2.2 <i>Sambucus canadensis</i>	29
2.2.3 <i>Salvia microphylla</i>	31
2.2.4 <i>Bidens alba</i>	32
2.3 Actividad antimicrobiana de extractos vegetales	33
2.4 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana	2
2.4.1 Método de dilución en caldo	2
2.4.2 Método de difusión de agar en disco.....	2
2.4.3 Método de Concentración Mínima Inhibitoria	4
2.5 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	4
2.6 Genotoxicidad y citotoxicidad de extractos vegetales	8
2.6.1 Métodos para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad.....	9
CAPÍTULO III	13
3. Metodología.....	14

3.1 Fase I	15
3.1.2 Estudio etnobotánico y selección de especies vegetales.....	15
3.2 FASE II.....	17
3.2.1 Elaboración de extractos vegetales	17
3.2.2 Caracterización química de los extractos vegetales	18
3.2.3 Pruebas Fitoquímicas	18
3.2.4 Cromatografía	22
3.2.4.1 Cromatografía en papel.....	22
3.2.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).....	23
3.3.1 Caracterización química por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	24
3.4.1 Pruebas Antimicrobianas	25
3.4.2 Microorganismos	25
3.4.3 Aislamiento de las bacterias	26
3.4.4 Pruebas de sensibilidad bacteriana; método de difusión en agar.....	27
3.4.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB)	28
3.5 Pruebas <i>in vivo</i>	29
3.5.1 Preparación de las muestras	30
3.5.2 Análisis estadístico	32
3.6 Purificación de los metabolitos del extracto <i>Sambucus canadensis</i>	33
3.6.1 Pruebas antimicrobianas de los metabolitos de <i>Sambucus canadensis</i>	33
FASE III.....	34
3.7.1 Pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad en el Bioensayo <i>Allium sativum</i>	34
4.1.2 Análisis estadístico.....	37
CAPÍTULO IV.....	38
4. Resultados y Discusión.....	39
4.1 FASE I.....	39
4.2 FASE II.....	45
4.2.1 Pruebas fitoquímicas.....	45
4.2.2 Pruebas cromatográficas y caracterización química por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de los extractos vegetales	47

4.3.3 Pruebas antimicrobianas <i>in vitro e in vivo</i>	50
4.3.4 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima bactericida.....	51
4.4 Sensibilidad bacteriana de metabolitos del extracto <i>Sambucus canadensis</i>	56
4.5 Pruebas <i>in vivo</i>	57
4.6 FASE III.....	63
4.6.1 Pruebas genotóxicas y citotóxicas del extracto <i>Sambucus canadensis</i>	63
5. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto vegetal <i>Sambucus canadensis</i> frente a cepas aisladas de alimentos ecológicos de Jaén, España.....	72
CAPÍTULO IV	79
4. Conclusiones generales	80
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	82
CAPITULO V	91
5. ARTÍCULO I	92
Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México.....	92
ANEXOS	104
2DO ARTICULO ENVIADO	105
ARTÍCULO II. In vitro and in vivo evaluation of antimicrobial activity of plants used in Mexican traditional medicine on foodborne bacteria.....	105
3ER ARTICULO ACEPTADO	121
ARTÍCULO III. Genotoxicity and cytotoxicity of <i>Sambucus canadensis</i> ethanol extract in meristem cells of <i>Allium sativum</i>	121

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Hojas de la especie *Ricinus communis*
- Figura 2. Flores y hojas de la especie *Sambucus canadensis*.
- Figura 3. Flores y hojas de la especie *Salvia microphylla*
- Figura 4. Hojas y flores de la especie *Bidens alba*
- Figura 5. Diagrama de flujo del diseño metodológico de cada fase experimental.
- Figura 6. Mapa de localización de la comunidad de San Miguel Eloxochitlan y comunidades aledañas.
- Figura 7. Maceración de las hojas de los extractos vegetales en el disolvente etanol.
- Figura 8. Proceso de extracción con el rotavapor marca Buchi. Laboratorio de Biotecnología Ambiental UPAEP.
- Figura 9. Pruebas fitoquímicas de cada extracto vegetal.
- Figura 10. Formación de espuma en la prueba de Saponinas de uno de los extractos vegetales evaluados.
- Figura 11. Técnica de cromatografía en papel, tomado de Anderson y Martínez; experimentos de Química Orgánica, 2013.
- Figura 12. Resultados de la prueba en cromatografía en papel, se muestran los revelados en luz UV larga y corta y en yodo.
- Figura 13. Proceso de Cromatografía en capa fina TLC, a) muestra del extracto en placa dentro de la cuba cromatográfica, b) proceso de separación de componentes,
- Figura 14. Análisis de las muestras en el espectrofotómetro en laboratorio de CESAT, UPAEP.
- Figura 15. Bacterias utilizadas en este estudio Gram + y Gram -.
- Figura 16. Prueba de sensibilidad bacteriana método de difusión en disco.
- Figura 17. Microplaca de 96 pocillos y lector de microplacas para determinar la Densidad óptica (DO).
- Figura 18. Pruebas *in vivo* utilizando el biomodelo *Solanum lycopersicum*.
- Figura 19. Crecimiento de bacterias en agar Bilis Rojo Violeta (BRV).
- Figura 20. Exposición de las raíces de *Allium sativum* al extracto vegetal de *Sambucus canadensis*
- Figura 21. Crecimiento de las raíces de *A. sativum* expuestas al extracto vegetal *Sambucus canadensis*.
- Figura 22. Exposición de las raíces de los ajos (2 mm) en portaobjetos, se hidrolizaron en HCl 1N por 10 minutos.
- Figura 23. Tinción de las raíces en cada concentración con aceto orceína.
- Figura 24. Observación de raíces con un microscopio óptico de fluorescencia Leica DM1000 LED con una cámara digital Jenoptik ProGres C10.
- Figura 25. Intervalo de edad de mujeres y hombres entrevistados en el estudio etnobotánico.

Figura 26. Las comunidades que mostraron mayor conocimiento basándonos en la frecuencia del uso de plantas.

Figura 27. Cromatografía TLC metabolitos del extracto vegetal *Sambucus canadensis*

Figura 28. Revelado de las placas bajo luz UV Lamp, P/N 95-0279-0, a las longitudes de onda de 254 y 365 nm.

Figura 29. Espectro de infrarrojo de 4000 to 600 cm^{-1} de las especies: *Sambucus canadensis*: línea amarilla, *Ricinus communis*: línea verde, *Bidens alba*: línea roja, *Salvia microphylla*: línea azul.

Figura 30. Halo de inhibición del extracto vegetal de *Salvia microphylla* frente a *S. aureus*.

Figura 31. Halo de inhibición del extracto vegetal de *Sambucus canadensis*

Figura 32. Pruebas antimicrobianas en postcosecha utilizando *Solanum lycopersicum* A) *S. aureus*, B) *E. faecalis* C) *E. coli* D) *K. pneumoniae*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Figura 33. Espectro de infrarrojo (IFTR) del extracto etanólico de *Sambucus canadensis*.

Figura 35. Crecimiento de raíces y tallo al iniciar el tratamiento de exposición con el extracto vegetal *Sambucus canadensis*

Figura 35. Crecimiento de raíces y tallo en el día 5 del tratamiento de exposición con el extracto vegetal *Sambucus canadensis*

Figura 36. Crecimiento de raíces y tallo al finalizar el tratamiento de exposición con el extracto vegetal *Sambucus canadensis*

Figura 37. Células de *Allium sativum* expuestas al extracto etanólico de *Sambucus canadensis* a) Cromosoma pegajoso b) puentes c) cromosoma pegajoso y rezagado con puentes d) cromosoma rezagado y pegajoso e) anafase anormal f) cromosoma rezagado g) cromosoma vagabundo, puente y cromosoma rezagado, h) puente y cromosoma vagabundo, i) puentes.

Figura 38. Resultados de la formación de biopelículas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

Figura 39. Resultados de la disgregación de biopelículas previamente formadas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Lista de plantas medicinales utilizadas en comunidades de la Sierra Negra de Puebla, México y estudios científicos que validan su actividad antimicrobiana.
- Tabla 2. Nombre tipo y clasificación de las bacterias utilizadas en este estudio.
- Tabla 3. Familias, nombres científicos, comunes, parte utilizada y formas biológicas de plantas medicinales utilizadas en la Sierra Negra de Puebla, México.
- Tabla 4. Resultados de la frecuencia de uso de plantas medicinales por enfermedades en la Sierra Negra de Puebla
- Tabla 5. Rendimiento de extractos vegetales y comparación de estudios sobre el rendimiento de las especies vegetales evaluadas en este estudio.
- Tabla 6. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios de los cuatro extractos etanolicos
- Tabla 7. Actividad bacteriana de los extractos vegetales y los halos de inhibición
- Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos vegetales contra los organismos de prueba.
- Tabla 9. Extractos vegetales con las concentraciones evaluadas y la CMB para cada bacteria *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*
- Tabla 10. Extracto vegetal, bacterias, concentración, media % de inhibición, Concentración Mínima Inhibitoria y valor de $p > 0.005$.
- Tabla 11. Diámetro de halos de inhibición de los metabolitos evaluados del extracto vegetal *Sambucus canadensis*.
- Tabla 12. Diámetro de halos de inhibición de los metabolitos con mayor actividad antimicrobiana
- Tabla 13. Número y longitud de raíces y tallo de *A. sativum* expuestos al extracto etanólico de *Sambucus canadensis*
- Tabla 14. Numero de células de *A. sativum* en las diferentes fases del ciclo celular, índice mitótico del extracto de *Sambucus canadensis*.
- Table 15. Anormalidades celulares observadas en *A. sativum* expuesto al extracto etanólico de *Sambucus canadensis*.
- Tabla 16. Cepas utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana y anti-biopelícula pertenecientes a dos tipos de colecciones del Laboratorio de Microbiología de los alimentos.

DEDICATORIA

*A Dios
A mis padres
A mis hermanos...*

A mis papas y hermanos que siempre estuvieron presentes apoyándome, que siempre han sido un ejemplo de perseverancia y fortaleza. Los amo y admiro profundamente...

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca doctoral otorgada. Asimismo, por la beca mixta asignada para realizar estancia en el extranjero, de igual manera quiero agradecer a la Dirección General de la Unidad de Estudios Posgrado de la Universidad Popular Autónoma de Puebla (UPAEP) por todas las facilidades y apoyo administrativo como enlace ante el CONACyT durante los estudios del doctorado, así como también por la beca de investigación que me fue otorgada.

Un agradecimiento especial a la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz mi directora de tesis por todo su apoyo incondicional, pero sobre todo por sus asesorías, consejos y enseñanzas, sin duda es un excelente ser humano. A mi co-directora la Dra. Verónica Rodríguez Soria, que siempre se mostró atenta y servicial para apoyarme en el proceso y desarrollo de la tesis.

A mis asesores el Dr. Luis Daniel Ortega quién siempre me ayudo y supo orientarme adecuadamente y a mi asesora externa la Dra. Anabella Handal por su apoyo y gestión para la realización de mis actividades experimentales. De igual forma quiero externar un agradecimiento especial a la Dra. Laura Mioni por su apoyo en el laboratorio y a la Dra. María R. por el recibimiento y amabilidad que tuvo conmigo durante en mi estancia en la Universidad Católica de Murcia, España.

No podría dejar de agradecer a la Dra. Elena Ortega y al Doctor Antonio Cobo por su invaluable apoyo y asesoría en mi estancia académica en la Universidad de Jaén. España, sin duda fue una experiencia sumamente enriquecedora e inolvidable.

A mis amigos que siempre me echaron porras, a mis colegas, a mis compañeros del posgrado, a Fernando que siempre estuvo a mi lado apoyandome, a mi Duncan que ha traído felicidad a mi vida y a todas las personas que directa e indirectamente me apoyaron para lograr esta meta... un agradecimiento infinito.

RESUMEN

Los extractos vegetales son una alternativa potencial para combatir bacterias que afectan la salud de las personas, en particular patógenos que afectan la inocuidad de los alimentos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de extractos vegetales utilizados en la Sierra Negra de Puebla, México frente a bacterias patógenas, asimismo, se determinó su citotoxicidad y genotoxicidad utilizando el biomodelo *Allium sativum*. El estudio comprendió 4 etapas (E1): E1. Selección de plantas para utilizarse como extractos vegetales. (E2): Determinar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de los extractos vegetales contra cepas bacterianas. (E3): Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad del extracto con mayor efecto antimicrobiano. (E4): evaluar el metabolito con mayor actividad antimicrobiana. Asimismo, se incluye un apartado en donde se evaluó la actividad biológica en la formación y disgregación de biofilm de cepas pertenecientes a la colección del laboratorio de Microbiología de los Alimentos y el Ambiente de la Universidad de Jaén, España.

En la primera etapa del trabajo (E1) se seleccionaron 4 plantas utilizadas en comunidades indígenas de la Sierra Negra de Puebla, México. Se aplicó una entrevista semiestructurada a 635 personas; se reportó el uso de 43 especies divididas en 21 familias. De todas las plantas registradas se seleccionaron 4 plantas para ser evaluadas en este estudio. En la segunda etapa (E2) se evaluó la actividad bacteriana mediante el método de difusión en disco y microplaca, asimismo se evaluó el efecto *in vivo* utilizando *Solanum lycopersicum* como biomodelo siguiendo las Normas de inocuidad de alimentos. En general, tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas fueron inhibidas por todos los extractos, mostrando halos de inhibición <8 mm. El extracto de *Sambucus canadensis* y *Bidens alba*, mostró las zonas más altas de inhibición siendo estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en comparación a los otros extractos y al control. Respecto a la CMI, los valores variaron de 68.1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, en las pruebas *in vivo* 3 extractos disminuyeron la cantidad de bacterias por debajo del límite máximo permitido (LMP) según la Norma Oficial Mexicana. En la tercera etapa (E3) se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad del extracto vegetal con mayor efecto antimicrobiano;

se utilizó el biomodelo *Allium sativum* con 5 tratamientos en concentraciones de 125, 250, 500, 1000 y 1500 mg/L. Se contabilizaron 2000 células por tratamiento, se evaluó el índice mitótico (IM) y anormalidades celulares (AC). Los datos se analizaron utilizando prueba de medias (ANOVA) y Chi cuadrada, se presentó una inhibición en el crecimiento de las raíces, a mayor dosis y tiempo de exposición del extracto etanólico, disminuyó el IM. Las AC aumentaron en las concentraciones más altas 500, 1000 y 1500 mg/L. Con los resultados obtenidos se puede indicar que la especie a altas concentraciones posee efectos anti proliferativos y actividad genotóxica sobre el ciclo celular de *Allium sativum*. En la cuarta etapa (E4) se evaluó el metabolito con mayor actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco y microplaca, encontrando información relevante sobre la actividad antimicrobiana que presenta la especie. Finalmente, en la última etapa de esta investigación, se realizaron ensayos con otras cepas de interés en los alimentos obtenidas del cepario de la Universidad de Jaén, España, la información encontrada en este estudio corrobora el efecto potencial de la especie para inhibir la formación de biopelículas, así como para disgregar películas previamente formadas, los resultados de esta investigación ayudan a validar el efecto potencial de los extractos vegetales como antimicrobianos naturales.

Palabras clave: antimicrobiano, plantas, etnobotánica, genotoxicidad, extractos, Sierra negra.

ABSTRACT

Plant extracts are a potential alternative to combat bacteria that affect human health, particularly pathogens that affect food safety. The objective of this study was to evaluate the efficacy of plant extracts used in the Sierra Negra de Puebla, Mexico against pathogenic bacteria, and their cytotoxicity and genotoxicity were also determined using the *Allium sativum* biomodel. The study comprised 4 stages (E1): IE. Selection of plants to be used as plant extracts. (E2): To determine the in vitro and in vivo efficacy of plant extracts against bacterial strains. (E3): Evaluate the genotoxicity and cytotoxicity of the extract with the greatest antimicrobial effect. (E4): evaluate the metabolite with the highest antimicrobial activity. Likewise, a section is included where the biological activity in the formation and disintegration of biofilm of strains belonging to the collection of the Laboratory of Food and Environment Microbiology of the University of Jaén, Spain is evaluated.

In the first stage of the work (E1), 4 plants used in indigenous communities of the Sierra Negra de Puebla, Mexico, were selected. A semi-structured interview was applied to 635 people; The use of 43 species divided into 21 families was reported. From all the registered plants, 4 plants were selected to be evaluated in this study. In the second stage (E2), the bacterial activity was evaluated by means of the disk and microplate diffusion method, and the in vivo effect was also evaluated using *Solanum lycopersicum* as a biomodel following the Food Safety Standards. In general, both Gram-positive and Gram-negative bacteria were inhibited by all extracts, showing inhibition halos <8 mm. The *Sambucus canadensis* and *Bidens alba* extract showed the highest inhibition zones, being statistically significant ($p < 0.05$) with respect to the other extracts and the control. Regarding the MIC, the values ranged from 68.1 to 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, in the in vivo tests 3 extracts decreased the amount of bacteria below the maximum allowed limit (PML) according to the Official Mexican Standard. In the third stage (E3) the genotoxicity and cytotoxicity of the plant extract with greater antimicrobial effect was evaluated; The biomodel *Allium sativum* was used with 5 treatments in concentrations of 125, 250, 500, 1000 and 1500 mg / L . 2000 cells were counted per treatment, the mitotic index (MI) and

cellular abnormalities (AC) were evaluated. The data were analyzed using test of means (ANOVA) and Chi square, an inhibition in the growth of the roots was presented, at a higher dose and exposure time of the ethanolic extract, the MI decreased. The ACs increased at the highest concentrations 500, 1000 and 1500 mg / L. With the results obtained, it can be indicated that the species at high concentrations has anti-proliferative effects and genotoxic activity on the *Allium sativum* cell cycle. In the fourth stage (E4), the metabolite with the highest antimicrobial activity was evaluated using the disk and microplate diffusion method, finding relevant information on the antimicrobial activity of the species. Finally, in the last stage of this research, tests were carried out with other strains of interest in food obtained from the strain of the University of Jaén, Spain, the information found in this study corroborated the potential effect of the species to inhibit the formation of biofilms, as well as to disintegrate previously formed films, the results of this research help to validate the potential effect of plant extracts as natural antimicrobials.

Keywords: antimicrobial, plants, ethnobotany, genotoxicity, extracts.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido de gran utilidad para el hombre no sólo porque sirven de alimento, sino también para aliviar y/o controlar enfermedades (Martínez *et al.*, 2006; Vivot y Cruañes, 2008; Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) alrededor del 80% de la población mundial de los países en desarrollo, utilizan las plantas como principal fuente de atención a su salud (Annan y Houghton, 2007; Calixto, 2008; Sotero-García *et al.*, 2018).

México se encuentra entre los países con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria, se han registrado más de 4,000 especies para remedios naturales (Barragán, 2006, Gómez, 2012; Kakuko *et al.*, 2015) para distintas afecciones como; bilis, dolor de estómago, riñón, tos, fiebre, gastritis, entre otros (Castillo-Juárez *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2011). El aprovechamiento de las plantas con fines medicinales se ha transmitido de una generación a otra generación, de manera que algunas costumbres subsisten y son ejercidas de forma cotidiana, tanto en zonas urbanas como en comunidades rurales sobre todo aquellos hablantes de alguna lengua las cuales son reconocidas por poseer grandes conocimientos tradicionales en el uso de las plantas (Caballero y Cortés, 2011; Leonti *et al.*, 2008). Asimismo, el uso está asociado con la presencia de curanderos, muchos de los cuales poseen un profundo conocimiento de la herbolaria (Canales *et al.*, 2005, Monroy y Castillo, 2007). Entre los estados en donde se utiliza una amplia variedad de plantas medicinales se encuentra el estado de Puebla (Cruz-García, 2007, Paredes, 2002, Vázquez *et al.*, 2011). Sin embargo, en la Sierra Negra de Puebla, a pesar de ser una zona que posee una gran riqueza vegetal, aún es escasa la información etnobotánica y científica que valide su uso medicinal tradicional (Casas *et al.*, 2011; Dávila *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha impulsado el uso de las plantas por ser una alternativa eficaz para combatir enfermedades infecciosas en el hombre con

escasos efectos secundarios, así como para evitar problemas de resistencia a los microorganismos debido al excesivo uso de medicamentos de síntesis química (Niño *et al.*, 2006; Miranda-Cruz *et al.*, 2012; Bullain-Galardis *et al.*, 2015). Martínez *et al.*, 2006; Pirondo *et al.*, 2011). Sin embargo, debido a que las plantas poseen números compuestos a los cuales se les atribuye su actividad farmacológica, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha insistido en que el uso de plantas medicinales debe basarse en estudios científicos que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para el uso en humanos, en este sentido además de evaluar la efectividad de los extractos vegetales, es necesario realizar pruebas que permitan valorar su inocuidad debido a posibles riesgos asociados a sus componentes los cuales pueden ser potencialmente tóxicos, cancerígenos o teratogénicos (Abdelmigid, 2013, Bratu *et al.* 2012, Prasansuklab *et al.* 2020). De acuerdo con Moore *et al.* (2020) y Pastori *et al.* (2013) la información científica disponible para la mayoría de las plantas medicinales aún es insuficiente para garantizar su uso seguro y eficiente (Ganjhu *et al.* 2015, Huang *et al.* 2015, Neira *et al.* 2018, Palatini y Komarnytsky, 2019, Soliman 2010; Sousa *et al.* 2011, Vazirian *et al.* 2018).

En este contexto, este estudio además de valorar la eficacia de plantas utilizadas en comunidades indígenas de la Sierra Negra de Puebla, México sobre bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos y por ende la salud de las personas mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, se evaluó el daño cromosómico y las alteraciones del ciclo mitótico mediante pruebas citotóxicas y genotóxicas utilizando el biomodelo *Allium sativum*.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El interés por utilizar productos naturales se ha incrementado en los últimos años, en particular aquellos derivados de fuentes vegetales (Albuquerque *et al.*, 2019; Geck *et al.* 2017). El mercado mundial de plantas medicinales y fármacos derivados de plantas en 2015 se estimó en 25600 millones de dólares y se espera que ascienda a 35400 millones de dólares en 2020 (Portillo-Torres *et al.*, 2019; Franco y Vázquez, 2020). A pesar de que las plantas se han utilizado por siglos con resultados favorables, aún existen muchas plantas de las cuales se desconocen sus propiedades, así como sus efectos potenciales frente a diversos patógenos, en particular sobre patógenos que afectan la inocuidad de los alimentos y por ende la salud de las personas. Las enfermedades transmitidas a través de los alimentos se han convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones sociales y económicas (Castro *et al.*, 2006, Ocaña *et al.*, 2018). Se estima que 600 millones de personas enferman cada año, 1 de cada 10 habitantes, 420 mil mueren (WHO, 2017). En la región de América cada año 77 millones de personas enferman y más de 9000 mueren (WHO,2018). México no es la excepción de hecho es uno de los países con mayores problemas de inocuidad en alimentos. El método más utilizado para eliminar la presencia de microorganismos patógenos es la aplicación de sustancias químicas (Miché y Balandreau, 2001, Zhuang, 2011,). Sin embargo, estas favorecen el desarrollo de bacterias multirresistentes (Bullain-Galardis *et al.* 2015; Miranda-Cruz *et al.* 2012; Niño *et al.* 2006 Levy *et al.*,2004). En este sentido, utilizar productos derivados de plantas pueden ofrecer mayor seguridad por derivar de fuentes naturales (Beuchat, 2001, Davidson y Zivanovic, 2003). Sin embargo, debido a que los extractos de plantas constituyen diversos compuestos de metabolitos a los cuales se les atribuye su efectividad, éstos también pueden tener efectos genotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos (Barbieri *et al.*, 2017; Borges *et al.* 2015). Diversos estudios indican que la información científica disponible para un gran número de plantas aún es insuficiente para garantizar su uso seguro, por tanto, es relevante realizar este tipo de estudios y de esta forma ofrecer un producto natural que además de eficaz sea inocuo al ambiente y a la salud de las personas que las utilizan potencialmente.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales son la principal fuente de atención médica en países en desarrollo, de acuerdo con Cassel y Machado (2008) representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados; mientras que, en los países en desarrollo, el uso de las plantas medicinales representa el 80%.

México representa uno de los países en donde existe una gran riqueza y conocimiento en el uso de la herbolaria, el estado de Puebla no es la excepción, sin embargo, existen escasos estudios sobre el uso de plantas en la Sierra Negra por ello es de particular importancia rescatar esos valiosos conocimientos de medicina tradicional pues en los últimos años ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento transmitido de padres a hijos (Benz et al., 2000; Katewa et al., 2004). Asimismo, existe una amplia variedad de plantas medicinales utilizadas tradicionalmente que aún no se han investigado sistemáticamente contra diversos patógenos microbianos y tampoco se ha validado su inocuidad. La búsqueda de literatura revela la realización de algunos estudios sobre la actividad antibacteriana de algunas de las plantas evaluadas en este estudio, sin embargo, los estudios antimicrobianos contra los patógenos que afectan la inocuidad de los alimentos son limitados y más aún los estudios que validen su uso seguro. En este estudio se evaluó la efectividad de cuatro extractos vegetales utilizados en comunidades indígenas frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas que son transmitidos principalmente a través de los alimentos y ocasionan graves problemas de salud, resulta importante utilizar productos de origen natural (extractos vegetales) para el control de bacterias patógenas para el ser humano y de esta forma evitar la resistencia que se genera por el excesivo uso de productos sintéticos. Del mismo modo, es importante evaluar la seguridad e inocuidad de estas plantas con estudios genotóxicos y citotóxicos para proporcionar información valiosa que permita generar una propuesta de antimicrobiano natural con base en extractos vegetales; que pueda ser utilizado en la industria agroalimentaria.

1.4 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de cuatro extractos vegetales como antimicrobianos naturales a través de la actividad antimicrobiana (*in vitro e in vivo*), y mediante pruebas genotóxicas para generar una propuestas segura y natural en el área de inocuidad de alimentos.

1.4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Realizar un estudio sobre plantas con potencial antimicrobiano en comunidades indígenas de la Sierra Negra de Puebla, México.
2. Generar extractos vegetales y caracterizarlos mediante pruebas fitoquímicas, cromatografía TLC y espectroscopia Infrarrojo (IFTR).
3. Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales en condicione *in vitro e in vivo*.
4. Determinar el efecto genotóxico y citotóxico del extracto vegetal con mayor actividad antimicrobiana utilizando el biomodelo *Allium sativum*.
5. Purificar los metabolitos secundarios del extracto con mayor actividad antimicrobiana por métodos cromatográficos para evaluar su actividad antimicrobiana.
6. Evaluar la actividad biológica (formación y disgregación de biopelículas) contra cepas de interés en los alimentos.

1.5 HIPÓTESIS

1.5.1 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

- Los extractos vegetales presentan actividad antimicrobiana en las cepas probadas en condiciones *in vitro* e *in vivo* y son inocuos en su uso.
- El extracto vegetal con mayor actividad antimicrobiana presenta actividad genotóxica en el biomodelo *Allium sativum*.
- Al menos un metabolito purificado del extracto vegetal presenta actividad antimicrobiana.

1.5.2 HIPÓTESIS NULA

- Ninguno de los extractos vegetales presenta actividad antimicrobiana en las cepas probadas en condiciones *in vitro* e *in vivo*.
- El extracto vegetal con mayor actividad antimicrobiana no presenta actividad genotóxica en el biomodelo *Allium sativum*.
- Ninguno de los metabolitos purificados del extracto vegetal presenta actividad antimicrobiana.

1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES

La presente tesis de investigación es un estudio que aborda la importancia de utilizar productos naturales derivados de plantas frente a bacterias patógenas que son transmitidos principalmente por los alimentos y afectan la salud de las personas, asimismo se evaluó el efecto genotóxico y citotóxico que estos extractos podrían tener debido a la gran cantidad de componentes que presentan. En una primera etapa se presenta un estudio etnobotánico en donde se realizó una investigación de campo en comunidades de la Sierra Negra de Puebla, México la cual es una zona de alta riqueza cultural pero también vegetal, sin embargo, no existen estudios para la zona que documenten el uso de plantas para tratar malestares por ello la importancia de rescatar estos conocimientos sobre el uso de plantas, el documentar los resultados de esta investigación se pretende abonar en estudios etnobotánicos del Estado y en particular de la región, asimismo, se pretende resaltar la importancia de este tipo de estudios. La principal limitación de esta fase de investigación es la cantidad de zonas reportadas es preciso documentar el uso de plantas en más comunidades de la Sierra Negra del Estado. En una segunda fase de esta investigación se seleccionaron y evaluaron cuatro plantas de las cuales se tienen escasos reportes científicos, se determinaron sus principales componentes químicos para poder asociarlos con la actividad biológica que presentaron frente a bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos, con el objetivo de tener una propuesta de un producto natural con base en extractos vegetales que sea útil para la industria agroalimentaria, asimismo debido a la importancia de evaluar el uso seguro de estos productos se realizó una evaluación del daño en material genético y alteraciones estructurales que el extracto podría ocasionar utilizando como biomodelo la especie *Allium sativum*. Esta fase del estudio no abarca el desarrollo de un producto solo se presentan bases científicas que pueden servir para proponer un producto natural con base en el estudio científico realizado, asimismo, es importante realizar la evaluación genotóxica y citotóxica con más especies biomodelo para tener mayor información sobre su uso seguro, aun así el biomodelo utilizado en este estudio ha sido reportado por números trabajos científicos como

una especie muy útil para evaluar este tipo de alteraciones. Por último, se presenta la evaluación de los metabolitos de la planta para referir a que metabolito se le puede asociar el efecto antimicrobiano. En este sentido, es importante resaltar la importancia de evaluar extractos crudos sin aislar sus componentes pues muchas veces la sinergia de sus componentes son los que presentan la mayor actividad biológica. Aun así, fue importante realizar el estudio y determinar los metabolitos con mayor actividad antimicrobiana, sin embargo, es necesario realizar la elucidación completa de las moléculas para tener mayor información. Aunado a toda la información obtenida en este estudio, se presentan datos sobre la actividad biológica del extracto vegetal frente a otras bacterias pertenecientes al cepario del departamento de microbiología de la Universidad de Jaén, España, los cuales puede servir de referencia para desarrollar más investigaciones sobre el tema. Asimismo, es importante indicar que el estudio presento diversas problemáticas la principal fue el detenimiento de las actividades experimentales debido a la pandemia COVID-19. De acuerdo al programa de doctorado el tiempo en cuanto a las actividades experimentales se redujo más de un año lo cual limito el estudio (elucidación de las estructuras del extracto vegetal con mayor efecto antimicrobiano y comparación de actividad biológica de diferentes cepas). Sin embargo, se presentan datos relevantes que pueden ser muy útiles para continuar con investigaciones similares resaltando la importancia del uso de productos naturales.

1.7 ESTRUCTURA DE LA TESIS

El presente documento de tesis se divide en capítulos, en el primer capítulo de la tesis se presenta una introducción, planteamiento del problema, justificación objetivos e hipótesis, el segundo capítulo aborda antecedentes generales en donde se presenta información importante sobre el trabajo realizado, el tercer capítulo aborda la metodología utilizada en cada una de las etapas del proyecto, en el cuarto capítulo se presentan resultados y discusiones de cada etapa del proyecto, los siguientes capítulos y anexos se enfocan en alcanzar los objetivos y se presentan como publicaciones. En el quinto capítulo se presentan conclusiones generales que se derivan de esta investigación, así como unas recomendaciones que surgen al concluir la presente tesis de investigación y podrían servir para para futuras investigaciones sobre el tema. El sexto capítulo se presenta un artículo publicado que aborda información acerca del conocimiento popular de las plantas medicinales utilizadas en comunidades indígenas de la sierra Negra de Puebla cabe mencionar que este es el primer estudio que reporta el uso de las plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla. Como anexos se presentan otros artículos derivados de la tesis, un segundo artículo se tratan los objetivos 2, 3 y 4 se hace un análisis con mayor detalle para validar los efectos de los extractos frente a bacterias de interés en los alimentos. Posteriormente en una tercera publicación se trata el quinto objetivo de la tesis; analizar el extracto vegetal con mayor actividad antimicrobiana y evaluar su inocuidad con estudios citotóxicos y genotóxicos utilizando como bioensayo la especie *Allium sativum* en una cuarta publicación se exponen los resultados derivados de la actividad anti-biopelícula del extracto vegetal frente a las cepas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Jaén, España, de esta forma se exponen los hallazgos de este trabajo.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINALES

Desde la antigüedad, el ser humano ha encontrado en las plantas un recurso útil para satisfacer muchas de sus necesidades, no solo de alimentación sino también el tratamiento de numerosas enfermedades (Chabán et al. 2019, Trap et al. 2020). En diversos lugares del mundo son la única fuente de atención médica, principalmente por factores económicos, geográficos o incluso por costumbres y tradiciones (Marcotullio et al. 2018, Tedesco et al. 2017, Ullah et al. 2013).

El uso de las plantas data desde los orígenes de la humanidad existen reportes de que nuestros antepasados podrían haber utilizado las plantas con distintos fines. Por ejemplo, se ha planteado la hipótesis de que el origen de la medicina humana puede estar relacionado con la introducción de plantas en la dieta de los primeros homínidos y algunos estudios indican su uso medicinal (Hardy, 2018). El uso de las plantas ha estado presente desde el origen de muchas civilizaciones. En Egipto en el año 2300 a. C., se cultivaron a orilla del río Nilo, el lino y el cáñamo; además de que tenían conocimientos de muchas familias botánicas (Ramírez, 2003). En la antigua China se han encontrado trabajos y obras ilustradas que datan del año 3000 a. C en donde se explica el uso de diversas plantas. En la India se descubrieron números especies como la canela y el cardamomo las cuales constituyeron desde el principio el más importante suministro de drogas, asimismo, también se han encontrado obras que relatan esencias, purgantes, vomitivos y contravenenos entre otros. En la antigua Grecia conocían las plantas y el valor terapéutico o tóxico de algunas de ellas, en el año de 459 a. C., Hipócrates, “padre de la medicina”, fue al mismo tiempo el fundador de la dietética científica, empleando medicamentos como tisanas, laxantes y diaforéticos. Los árabes se apropiaron y perfeccionaron conocimientos antiguos, hubo varios médicos que se ocuparon de las plantas medicinales, además, los árabes contribuyeron a la difusión de diversas plantas útiles y medicinales en las costas del Mediterráneo, Francia, Italia y España. En el

Renacimiento, la botánica se transformó en una ciencia independiente con una multitud de obras publicadas sobre plantas medicinales. Tras el descubrimiento de América, hubo un gran intercambio de semillas de plantas medicinales, y se diversificó el uso de éstas. Actualmente América Latina continúa aportando materias primas de importantes plantas medicinales que son objeto de industrialización en el mundo (Ocampo y Mora et al., 2010). Los países latinoamericanos tienen decenas de miles de especies de plantas (Castro et al., 2017) y México se encuentra entre los países con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de las plantas (Barragán, 2006). Puebla se encuentra entre los estados en donde se presenta una amplia riqueza vegetal debido a la variedad de climas que van desde templados, cálidos hasta los áridos (Paredes-Flores et al., 2002; Cruz-García, 2007; Vázquez et al., 2011). Sin embargo, son escasos los trabajos que reportan el uso de las plantas medicinales, García (2002) registra las plantas medicinales que se venden en mercados. López (2011) reporta el uso de plantas por dos grupos étnicos de Pantepec, Puebla”; Barranco (2001) realizó un estudio exploratorio de plantas medicinales en Zoloquiapan, Puebla. Paredes (2002) en su investigación contribución al estudio etnobotánico de la flora útil de Zapotitlán de Salinas, Puebla, enlistó 90 especies de uso medicinal. Rocha (2003) realizó un estudio preliminar de la actividad antibacteriana de las plantas reportadas como medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Vega (2004), realizó un trabajo en el que enlistó el uso de plantas medicinales de interés zootécnico. Vázquez-Medina et al. (2011) realizó un estudio para identificar conocimientos y prácticas de hombres y mujeres sobre plantas medicinales y su relación con la visión salud-enfermedad en dos comunidades nahuas en Coyomeapan, Puebla, México. Sin embargo, para la región de la Sierra Negra de Puebla no se encontraron trabajos que reporten el uso de plantas medicinales, su actividad antimicrobiana ni genotóxica.

2.2 EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS EN LA SIERRA NEGRA DE PUEBLA

Entre las plantas utilizadas en comunidades indígenas de la Sierra Negra de Puebla se encuentran *Ricinus communis*, utilizada principalmente como laxante, antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, principalmente por sus constituyentes fitoquímicos, como flavonoides, saponinas, glucósidos y alcaloides (Jena et al., 2012; Mann et al., 2013; Ribeiro et al., 2016). La especie *Sambucus canadensis* es reconocida por tener propiedades medicinales, antivirales, asociados a triterpenos, glucósidos, fenoles, flavonoides, taninos y cumarinas (Lee and Finn, 2007; Ulbricht et al., 2014). La especie *Salvia microphylla* tiene efecto antioxidante, antiinflamatorio, antimutagénico por lo que se considera ser una fuente prometedora de genoprotectores naturales (Azqueta et al., 2010; Fazly-Bazzaz et al., 2002; Knezevic-Vukcevic et al., 2005). La especie *Bidens alba* tiene funciones de antiséptico, antiinflamatorio, desórdenes gastrointestinales y en el tratamiento de lesiones, hipertensión, ictericia y diabetes (Lans, 2006) principalmente por sus principios activos flavonoides, triterpenos, ácidos grasos (Ong et al., 2008). A continuación, se presenta información detallada de las especies evaluadas en este estudio.

2.2.1 RICINUS COMMUNIS

Pertenece a la familia Euphorbiaceae conocida popularmente como planta de ricino, es un arbusto perenne de crecimiento rápido de hasta 6 metros o más, pero no es de naturaleza resistente. Esta planta se cultivó para obtener colores de hojas y flores y para la producción de aceite. Las hojas son de color verde o rojizo y de unos 30 a 60 cm de diámetro. Las hojas contienen 5-12 lóbulos profundos con segmentos dentados gruesos que son alternados y palmeados. Los tallos varían en pigmentación. Las flores son monoicas y miden unos 30-60 cm. de largo. El fruto es una cápsula espinosa. Las semillas presentan diferencias considerables en tamaño y color. Es una planta que tiene un alto valor tradicional y medicinal, la planta se utiliza como laxante, purgante, fertilizante y fungicida, también se ha reportado que posee efectos beneficiosos tales como antioxidante, antihistamínico, anticonceptivo,

antiasmático, antidiabético, hepatoprotector, antiinflamatorio, también se ha reportado su uso en la cicatrización de heridas, insecticida y larvicida (Jena y Gupta, 2012; Soltis, 2005). Respecto a la actividad antimicrobiana de la especie se han reportado efectos potenciales frente a diversas cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus* entre otras. El aceite de ricino obtenido a partir de la semilla de la planta se usa ampliamente en aplicaciones medicinales, también se utiliza como combustible para lámparas, componente de los cosméticos, en la fabricación de jabones, tinta de impresora, plásticos, fibras, líquido hidráulico, líquido de frenos, barnices, pinturas, líquido de embalsamamiento, tintes textiles, acabados de cuero, adhesivos, ceras y fungicidas (Jena y Gupta, 2012).



Figura 1. Hojas de la especie *Ricinus communis*

2.2.2 SAMBUCUS CANADENSIS

La especie *Sambucus canadensis* pertenece a la familia Adoxaceae, es conocida comúnmente como “Sauco” es originaria de una gran región de Norteamérica al este de las Montañas Rocosas, y al sur por el este de México y América Central a Panamá. Crece en una variedad de condiciones incluyendo suelos húmedos y secos, sobre todo en lugares soleados (Finn et al., 2008) es un arbusto de hoja caduca que alcanza hasta los 3 m de altura o más. Las hojas están dispuestas en

pares opuestos, son pinnadas con cinco a nueve foliolos, las inflorescencias son de 20-30 cm de diámetro en forma de corimbos con flores de color blanco sobre el follaje, las flores individuales tienen 5-6 mm de diámetro, con cinco pétalos. El fruto es una baya de color púrpura oscuro a negro de 3-5 mm de diámetro, se producen en racimos colgantes en el otoño. Se han utilizado varias partes de la planta de *Sambucus nigra* por sus propiedades laxantes, diuréticas, expectorantes o purgantes para tratar trastornos respiratorios y pulmonares, así como fiebre y reumatismo (Finn y Thomas, 2010). Las hojas tienen uso externo para tratar inflamaciones, quemaduras, conjuntivitis (Charlebois, et al., 2010). Además, las flores son la parte del saúco más utilizada en fitoterapia debido a que contiene mucílagos con propiedades antitusígenas, emolientes y ligeramente laxantes (Charlebois, et al., 2010). Las flores secas contienen taninos, aceites esenciales y sobre todo rutina, beneficiosa para los capilares, utilizadas como estimulante de la circulación. Recientemente, los extractos de las bayas de algunas variedades demostraron un potencial quimiopreventivo significativo contra las etapas de iniciación y promoción de la carcinogénesis (Thole et al., 2006). La especie nativa americana de baya del saúco, *Sambucus canadensis*, no ha sido cultivada, criada y promocionada como planta medicinal como *Sambucus nigra* y los estudios acerca de la especie son escasos.



Figura 2. Flores y hojas de la especie *Sambucus canadensis*.

2.2.3 *SALVIA MICROPHYLLA*

La especie pertenece a la familia Lamiaceae, es un gran grupo con más de mil especies de plantas. La especie es un arbusto que llega a medir de 1 a 2 m de largo; hojas lanceoladas a ovaladas, flores rojas, de aproximadamente 2 cm de largo, florece de agosto a noviembre. Los tallos son pubescentes y pueden presentar coloraciones rojizas (Villavicencio et al. 2000). Es originaria del sudeste de Arizona y de las montañas del este, oeste y sur de México comúnmente llamada como mirto de monte, o mirto de las montañas. Se han reportado diversos usos medicinales los cuales se atribuido a los compuestos fenólicos, por lo que se considera ser una fuente prometedora de genoprotectores naturales principalmente por la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides. Se ha informado que estos fitocompuestos exhiben una amplia gama de actividades biológicas; antioxidantes, antiinflamatorios, efectos antimutagénicos y antitumorales.



Figura 3. Flores y hojas de la especie *Salvia microphylla*

2.2.4 *BIDENS ALBA*

La especie *Bidens alba* pertenece a la familia Asteraceae se encuentra en Tamaulipas, San Luís Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Rzedowski y Rzedowski, 2008). Produce flores durante todo el año y produce una gran cantidad de polen para que las abejas recolecten y generen néctar, mide de 5 hasta de 3 m de largo, sus tallos son erectos o decumbentes (recostados) las hojas son pecioladas, simples o compuestas, sus flores son blancas con nervaduras oscuras. La especie se usa ampliamente para el tratamiento de cortes, lesiones, hinchazones, hipertensión, ictericia y diabetes (Lans, 2006, 2007). También como diurético y en el reumatismo. Esta planta ha sido investigada por la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *S. lutea* y *B. subtilis* los cuales se han asociado principalmente a la presencia de taninos. También se ha demostrado que podría tener valor terapéutico contra el cáncer colorrectal humano (Ong et al., 2008).



Figura 4. Hojas y flores de la especie *Bidens alba*

2.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS VEGETALES

Los agentes antimicrobianos son sustancias químicas capaces de inhibir o eliminar el desarrollo de microorganismos patógenos, estas se pueden clasificar según su origen en sintéticas, semisintéticas y naturales, los agentes antimicrobianos de origen sintético son aquellos que se obtienen por síntesis química, los semisintéticos se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, mientras que los de origen natural se obtienen a partir de animales, plantas y microorganismos (Franco y Vázquez et al., 2020; Khoobani et al., 2019). El método más utilizado para eliminar la presencia de microorganismos patógenos son los antimicrobianos de origen sintético. Sin embargo, su utilización excesiva ha desarrollado bacterias multirresistentes. La resistencia a múltiples fármacos se descubrió en enterobacterias como *Escherichia coli*, *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* a finales de la década de 1950 y comienzos de la década de 1960. Debido al uso indiscriminado de antimicrobianos, la resistencia se diseminó en diferentes bacterias y se hizo más común en todo el mundo (Mathur y Singh, 2005, López- Cuevas et al., 2009). Actualmente la resistencia a los antimicrobianos es una de las principales amenazas a las que se enfrenta la medicina moderna (WHO, 2018).

En México, los antimicrobianos se encuentran entre los medicamentos que más se venden y se consumen: representan un mercado anual de 960 millones de dólares y el segundo lugar en ventas anuales (14.3%) en farmacias privadas en el país (Chacon et al., 2015). Una alternativa potencial a los antimicrobianos sintéticos son los de origen natural, éstos pueden clasificarse por su origen: origen animal, incluye proteínas, enzimas tales como lisozima, hidrolasas (Beuchat, 2001) y polisacáridos como el quitosán (Davidson y Zivanovic, 2003). Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001). Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos. De particular interés en esta tesis son los antimicrobianos derivados de fuentes vegetales, numerosos estudios han determinado que los extractos vegetales tienen actividad contra diversos microorganismos patógenos (Tabla 1).

Los extractos vegetales presentan distintos componentes; fenoles; aldehídos, cetonas, alcoholes, éteres, hidrocarburos entre otros (Kalembe y Kunicka 2003). La biosíntesis de estas moléculas es llevada ya sea de manera constitutiva, patógeno-independiente (fitoanticipinas) o si es inducida como una parte de la respuesta defensiva de las plantas en contra de bacterias u hongos (fitoalexinas) en este grupo se encuentran las flavanonas, las isoflavonas, las auronas y los fenalenones (Tanaka, Sato et al. 2002; Luque-Ortega, Martínez et al. 2004). Otros metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, alcaloides y otros compuestos actúan como mecanismos de defensa de las plantas.

Tabla 1. Lista de plantas medicinales utilizadas en comunidades de la Sierra Negra de Puebla, México y estudios científicos que validan su actividad antimicrobiana.

<i>Familia</i>	Nombre científico	Nombre común	Parte usada	Enfermedad que alivia	Actividad antimicrobiana	Referencia científica
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Dysphania ambrosioides</i>	Epazote	HJ	picaduras, parásitos intestinales, diarrea, coraje, acelera el parto, eficaz contra la presión, algunos hongos y bacterias	<i>Tripanosoma cruzi, Plasmodium falciparum, Leishmania amazonensis</i>	Gómez-Castellanos, 2008
<i>Apiaceae</i>	<i>Apium graveolens</i>	Apio	HJ	Dolor, reumas, inflamación, cáncer.	<i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus.</i>	Baananou, 2013
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus acuminata</i>	elite	HJ	Dolor, diarrea		S.R
<i>Cactaceae</i>	<i>Opuntia sp</i>	Nopal		Dolor de estómago, cicatrizante	<i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli.</i>	Ammar, 2012
<i>Asteraceae</i>	<i>Tagetes erecta</i>	Cempazuchil	HJ, FL	Diarrea, cólicos, bilis, mal aire, tos, fiebre, úlceras y heridas, protege el hígado alivia el dolor y la inflamación	<i>K. pneumoniae, E.coli, Streptococcus faecalis, Mycobacterium phlei, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Candida albicans</i>	López et al. 2001
	<i>Heterotheca inuloides Cass</i>	Árnica	HJ, T, FL	Vómito, Inflamación, dolor estomacal, cicatrizante	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kubo et al. 1994, 1996

				<i>Giardia intestinalis</i>	Rodríguez et al. 2015
<i>Matricaria recutita</i>	Manzanilla	HJ, R, FL	Dolor de estómago, cólicos, diarrea, disentería, irritación de los ojos.	<i>S. aureus, Candida strains</i>	Nogueira et al. 2008
					Vikas et al. 2010
<i>Artemisia ludoviciana Nutt</i>	Estafiate	T, HJ	Temperatura, baños posparto, diarrea, dolor de cintura y espalda, empacho, bilis, piedras en el riñón, cólicos, resfriados, bronquitis, reumas, menstruación, Abortivo, desparasitante.	<i>Scherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, dermatophytes Trichophyton rubrum, Microsporium canis, Microsporium gypseum, Helicobacter pylori</i>	López-Lutz et al. 2008
					Castillo-Juárez et al.2008
				<i>Escherichia coli, Shigella sonnei Shigella flexneri, Salmonella sp.</i>	
					Alanís et al. 2005
<i>Artemisia absinthium</i>	Hierba maestra	HJ	Dolor de estómago, bilis, cólico, desparasitante.	<i>Fusarium oxysporum Aspergillus niger Escherichia coli Staphylococcus aureus Trypanosoma brucei</i>	Abad et al., 2012
				<i>Escherichia coli species, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Salmonella sp.</i>	Alanís et al. 2005

	<i>Haplopappus venetus (Kunth)</i>	Escobilla	HJ	Dolor de estómago, empacho, bilis, desparasitante, sarna, Enfermedades de la piel y el cabello, fiebre,		S.R
	<i>Tanacetum parthenium</i>	Santa María	HJ	Dolor de estómago, diarrea, fiebre	<i>Bacillus subtilis, B. cereus, Micrococcus luteus & Staphylococcus aureus), Gram negative bacteria (Yersinia enterocolitica, Klebsiella oxytoca, Serratia marcescens, Escherichia coli & Pseudomonas aeruginosa) and yeast (Candida albicans). R</i>	Izadi, 2010
	<i>Senecio salignus</i>	Azomiate	HJ	Torceduras, espanto, mal de ojo		S.R
Asparagaceae	<i>Yucca sp.</i>	Izote		dolor de, cuerpo oído		S.R
Amaryllidaceae	<i>Allium sativum</i>	Ajo		Sistema inmunológico y cardiovascular	<i>Staphylococcus aureus, Salmomella</i> <i>Hongos; Aspergillus niger, Penicillium cyclopium Fusarium oxysporum</i>	Benklebia, 2004 Onyeagba, 2004 <i>Staphylococcus aureus; Bacillus spp., Escherichia coli and Salmonella spp</i>
	<i>Sansevieria trifasciata</i>	Lengua de vaca	HJ	Granos, calentura, Hinchazones, dolor, prevención de cáncer, cicatrización.		S.R

Apiaceae	<i>Cuminum cyminum</i>	Comino				S.R
Caprifoliácea	<i>Sambucus mexicana</i>	sauco	HJ, T	Dolor de huesos, desinflamante, baños posparto, tos, bronquitis, fiebre, bilis, desparasitante problemas del cabello y piel, sarampión, sarna, rabia purgante, desinfectante y diurético y es utilizado infecciones de ojo y oídos.	<i>Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis. Moraxella catarrhalis, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa, Legionella pneumophila, Chlamydia pneumoniae,</i>	Cáceres et al. 1990 Pérez-López, 2005
Lamiaceae	<i>Salvia microphylla</i>	Mirto	HJ, T	Disentería, espanto, baños postparto, dolor de estómago, cabeza, huesos, bilis, granos en la piel.	<i>Escherichia coli, Salmonella thyphimurium, Haemophilus influenzae,</i> <i>Streptococcus pneumoniae y Staphylococcus aureus.</i>	Hernandez, 2007
	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano		Bronquitis, resfriado, tos		S.R
Lauraceas	<i>Cinnamomum verum</i>	Canela		Bronquitis, tos, diarrea, diabetes, reuma, artritis, circulación		S.R
	<i>Mentha spicata</i>	Hierba buena		Antiséptico, analgésico, antiinflamatorio		S.R
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero		Dolor de estómago, úlcera, diarrea, gastritis, colitis, desinflamante	<i>Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtili, Candida albicans</i>	Celiktas, 2007

<i>Meliaceae</i>	<i>Cedrela odorata</i>	Cedro	C	Problemas respiratorios, heridas, dolor de estómago, fiebre.	<i>Bacillus cereus, Aspergillus niger.</i> <i>Plasmodium berghei (actividad malaria)</i>	Villanueva et al. 2009 Do Céu Madureira et al. 2002
<i>Myrtaceae</i>	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba	HJ, FR	Diarrea, dolor de estómago. caries, hinchazón, bilis, hemorragia vaginal, heridas, fiebre	<i>Staphylococcus aureus</i>	Jaiarj, 1999
	<i>Eucalyptus sp.</i>	Eucalipto	HJ	Infecciones respiratorias.		S.R
<i>Polemoniaceae</i>	<i>Loeselia mexicana</i>	Espinosilla	T, HJ, FL	Fiebre, tos, hemorragias y baños postparto, diarrea, gripa, dolor de huesos, purgante, diurética, enfermedades de la piel y el cabello.	<i>Cladosporium cucumerimun y Penicillium oxalicum</i> <i>E. coli, Salmonella typhi, Shigella sp., Vibrio cholerae.</i> <i>Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, E. coli, Klebsiella neumoniae, Salmonella typhimurium, Candida albicans, Trichophyton mentagrophytes y Trichophyton rubrum</i> <i>Klebsiella pneumoniae, E.coli, Staphylococcus aureus</i>	Heinrich et al. 1992 Rojas et al. 1999 Navarro et al. 2011

					Vega, 2013
<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus ayacahuite</i>	Acahuite	HJ	Empacho, purgante. Enfermedades de la piel	S.R
<i>Primulaceae</i>	<i>Primula vulgaris</i>	San Pablito	HJ	Dolor de cabeza, tos, temblores, afecciones bronquiales	S.R
	<i>Prunus salicifolia</i>	Hoja de capulín	HJ, C	fiebre, diarrea y disentería, dolor de cabeza, inflamación.	<i>Salmonella typhimurium Proteus mirabilis,</i> <i>Escherichia coli and Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> Jiménez, 2011
	<i>Prunus persica</i>	Durazno	FR	Tos, disentería, baños postparto.	S.R
<i>Rutaceae</i>	<i>Ruta graveolens</i>	Ruda	HJ,T,FL	cicatrizante, desinfectante, desinflamante, analgésico	<i>Staphylococcus aureus, Streptococcus</i> <i>pyogenes, Listeria monocytogenes and</i> <i>Bacillus subtilis</i> Ivanova et al .,2005
	<i>Citrus X sinensis</i>	Hojas de naranja	FR, C	Problemas digestivos, cólicos tos, flema y resfriados. propiedades antioxidantes	S.R
	<i>Citrus x limon</i>	Limón	FR	Tos, gripa, gingivitis, gastritis	S.R
	<i>Citrus x aurantiifolia</i>	Flor de lima	HJ,FL	resfriados, gripe	S.R
<i>Rubiaceae</i>	<i>Hamelia patens Jacq</i>	Hierba santa Cimarrón	HJ	Cicatrizante, dolor, inflamación, fiebre, salpullido,	Ahmad, 2012

				Prevenir el cáncer, malestares del riñón, diabetes y dolor de muelas.	
<i>Solaneaceae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	HJ	Enfermedades de la piel, quemaduras, herpes, mal aire	
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jitomate	HJ	Diurético, digestivo, laxante, enfermedades hepáticas, quemaduras, obesidad, raquitismo, ayuda a combatir cáncer de mama, cataratas y asma	S.R
<i>Tiliáceas</i>	<i>Tilia Europea</i>	Flor de Tila	HJ	Estrés, relajante, nervios, ansiedad, gastritis	S.R
<i>Verbenácea</i>	<i>Lantana hispida</i>	Tapón	HJ	Diarrea y disentería.	S.R
<i>Xanthorrhoeaceae</i>	<i>Aloe barbadensis</i>	Sábila	HJ	Postparto, Hinchazones, dolor, tos, Malestares estomacales, reumas, caída del cabello	<i>Enterococcus bovis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Morganella morganii, and Klebsiella pneumoniae</i> Pandey, 2010

- Tallos (T) Hojas (HJ) Flores (FL) Corteza (C).

2.4 MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Existen diversas técnicas para evaluar la actividad antimicrobiana, entre los principales métodos para determinar la efectividad de un microorganismo a un compuesto se encuentran; los métodos de dilución en caldo, prueba de difusión en agar, determinación de células sobrevivientes, microplaca entre otros. La selección del método de análisis dependerá del objetivo de la investigación (Hernández et al., 2003, Ramírez et al., 2009).

2.4.1 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

El método de dilución es útil para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un agente químico a un microorganismo, se inoculan a un cultivo del microorganismo en estudio, cantidades específicas del agente químico, preparado en concentraciones decrecientes en caldo o agar por la técnica de dilución seriada en tubo. Se determina la susceptibilidad del microorganismo, después de un período de incubación de 48 h, por la observación macroscópica de la presencia o ausencia de crecimiento en las distintas concentraciones del agente químico. La concentración mínima del agente antimicrobiano que no muestra crecimiento es la medida del efecto bacteriostático del agente químico sobre el microorganismo. Este método se considera el más exacto para la determinación de la susceptibilidad en volumen medido (en unidades o microgramos) del compuesto a evaluar.

2.4.2 MÉTODO DE DIFUSIÓN DE AGAR EN DISCO

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En general, se usan en papel o en pozo. Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con la finalidad de evitar un crecimiento exhaustivo el cual puede variar significativamente la respuesta del compuesto probado. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio

ha sido estandarizada en 5×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de MacFarland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (Hernández et al., 2003). Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (Winn et al., 2008). El método de difusión en agar está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (Método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de (NCCLS, 2001).

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Doughari, 2006). En este método, se colocan con todo cuidado sobre la placa de cultivo en agar, inoculada con el microorganismo a estudiar, discos de papel filtro impregnado con diferentes agentes antimicrobianos en concentraciones específicas. Se incuba la placa 24 h y se observa la aparición de una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco que contiene el agente antimicrobiano al cual es susceptible el microorganismo, los microorganismos que son resistentes crecerán hacia la periferia del disco. Su sencillez, rapidez y reproducibilidad la convierten en una de las pruebas más útiles, y más empleadas para la determinación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos.

2.4.3 MÉTODO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar) (Hernández et al., 2008). Esta metodología es complicada, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La utilización de micropipetas y de placas facilitó la utilización del método de micro dilución con caldo. Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. Se consideran métodos indicados cuando además de la actividad inhibitoria se quiere determinar también la actividad bactericida (NCCLS, 2002).

2.5 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) representan uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial (Castro et al., 2006, Ocaña et al., 2018). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA afectan con mayor severidad a niños, mujeres embarazadas, ancianos y personas con otros padecimientos; sin embargo, estas enfermedades no solo afectan la salud, sino que también tienen un impacto socioeconómico.

Se estima que entre 17 y 20 millones de personas mueren anualmente a causa de enfermedades infecciosas (OMS, 2018). La OMS estima que, en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1500 millones de casos, y 3 millones de niños menores a 5 años de edad mueren anualmente. En Estados Unidos de América (E.U.A.), se estima que alrededor de 76 millones de personas se enferman anualmente de una ETA, 325000 se hospitalizan y 5000 mueren, implicando costos

enormes en salud y estas cifras aumentan en países en desarrollo. Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer. Sin embargo, se desconoce la real magnitud de los brotes de ETA, dado que son pocas las personas que se atienden en centros médicos.

Las bacterias patógenas tienen capacidad de transmitirse de un ser vivo infectado a otro de múltiples formas (Izarra et al., 2000) en el caso de los alimentos, las bacterias pueden propagarse de unos a otros durante el proceso de preparación, por ejemplo, si las manos no están limpias o al utilizar utensilios de cocina sucios. Es lo que se conoce como contaminación cruzada. Asimismo, los insectos pueden transmitir bacterias patógenas a la comida, como ocurre con las moscas que, tras alimentarse de heces, transmiten microorganismos como *Salmonella sp.* o *Escherichia coli*. La salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad nutricional de los alimentos que consumen, la cual a su vez depende de la calidad higiénica y sanitaria en toda la cadena productiva, si bien la falta de higiene y de sanidad en el procesamiento y preparación de los alimentos es un problema que puede ocurrir en cualquier lugar del mundo, la incidencia de enfermedades causadas por los alimentos se encuentra con más frecuencia en los países en vías de desarrollo (Koper et al., 2009).

Las ETA han incrementado en su ocurrencia debido al surgimiento de nuevas formas de transmisión, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos. Ante el crecimiento de la población mundial, la intensificación e industrialización de la agricultura y la producción ganadera se plantean mayores retos para lograr la inocuidad de los alimentos aunado a lo anterior el cambio climático con los cambios de temperatura pueden modificar los riesgos que amenazan la inocuidad de los alimentos. En años recientes, la frecuencia de brotes asociados al consumo de productos hortofrutícolas se ha elevado, particularmente como resultado del incremento en la demanda por los productos mínimamente procesados (Beuchat, 2002). Si bien hay diversas bacterias causantes de la contaminación de alimentos en la presente tesis de investigación

nos enfocamos en las bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *Kl pneumoniae*.

La bacteria *Escherichia coli*; forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, es utilizada como indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales. Varios estudios han documentado que ciertas cepas de *E. coli* producen diarrea y otras enfermedades extraintestinales en humanos con base en sus factores de virulencia específicos y rasgos fenotípicos se han subdividido en seis grupos patógenos *E. coli enteropatogénica* (EPEC), *E. coli enteroagregante* (EAEC), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli enteroinvasora* (EIEC) y *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) (43, 44). Estos grupos han sido detectados en diferentes productos, como cárnicos, lácteos, pescados, mariscos, bebidas, hielo y leguminosas.

Staphylococcus aureus; es un coco Gram positivo cuyas células miden aproximadamente 1 µm de diámetro, se agrupan en racimos que son indicativos de que tienen la capacidad de dividirse en más de un plano. Su respiración es aeróbica y anaeróbica y la mayoría de las cepas pueden fermentar el manitol de manera anaeróbica (Briskin 2000; Haddadin, Fappiano et al. 2002). Los estafilococos son organismos oportunistas y patógenos adaptables que tienen la capacidad de infectar, invadir, persistir y replicarse en cualquier tejido humano incluyendo la piel, los huesos, órganos internos o tejido vascular. El *S. aureus* es uno de los principales patógenos en humanos y animales, capaz de causar una amplia gama de infecciones de diferente severidad, ha desarrollado de forma gradual una resistencia a todas las clases de antibióticos entre estos la meticilina y la penicilina. El surgimiento de cepas resistentes se ha presentado en varios grupos bacterianos, su capacidad de producir enfermedad está fuertemente relacionada con el amplio uso de los antibióticos (Knobler 2003; Dryla, Prustomersky et al. 2005). Se le asocia con una gran variedad de infecciones clínicas incluyendo septicemia, neumonía, sepsis de heridas, artritis séptica, osteomielitis y el síndrome de shock tóxico con tasas sustanciales de morbilidad y mortalidad. Aunque las infecciones causadas por

S. aureus resistentes a los antibióticos, conducen a serios problemas en la población en general, tales infecciones pueden ser particularmente devastadoras para los jóvenes, los adultos mayores y las personas inmunocomprometidas (Shittu et al. 2006). Los estafilococos son causa importante de infecciones humanas, pero también se encuentran como microorganismos no patógenos en muestras fecales humanas (Dominguez et al. 2002).

Klebsiella pneumoniae: son bacilos Gram negativos se considera una bacteria nociva para el ser humano, debido a que el sistema inmunitario es incapaz de eliminarla y las infecciones ocurren normalmente en entornos sanitarios. Causa graves enfermedades, incluyendo neumonía, infecciones del torrente sanguíneo y meningitis; se ha demostrado que esta cepa bacteriana ha desarrollado resistencia a los carbapemas un antibiótico de tipo betalactámico, su presencia en alimentos se ha asociado al manejo de productos alimenticios por personas enfermas.

Enterococcus faecalis; los enterococos han ganado notoriedad en las últimas décadas como causas frecuentes de infecciones del torrente sanguíneo, del tracto urinario y de heridas quirúrgicas, resistentes a los antibióticos, adquiridas en el hospital; y por su capacidad para transferir resistencias a antibióticos a otros microbios (McBride et al., 2007, Díaz-Pérez et al.,2010). El tratamiento de las infecciones por *E. faecalis* a menudo se ve confundido por la resistencia a los antibióticos como cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, tetraciclina, aminoglucósidos, vancomicina entre otros (Sheppard et al., 2002).

Vibrio cholerae; el cólera es una infección intestinal aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados por la bacteria. Tiene un periodo de incubación corto, entre menos de un día y cinco días, y la bacteria produce una enterotoxina que causa una diarrea copiosa, indolora y acuosa que puede conducir con rapidez a una deshidratación grave y a la muerte si no se trata prontamente. La mayor parte de los pacientes sufren también vómitos. La mayoría de las personas infectadas por *V. cholerae* no presentan síntomas, aunque la bacteria esté presente en sus heces durante los 1 a 10 días siguientes a la infección, con el consiguiente riesgo de infección de otras personas. En el 80% de las personas que presentan síntomas

estos son de leves a moderados; un 20% padece diarrea acuosa aguda con deshidratación grave. Si no se da tratamiento, esta puede ocasionar la muerte. El cólera representa aún una amenaza mundial y es un indicador fundamental del grado de desarrollo social, casi todos los países en desarrollo tienen que hacer frente a brotes de cólera (Farfan et al., 2002).

Salmonella typhimurium, es un patógeno universal que causa gastroenteritis en humanos, 21,5 millones de personas por año se ven afectadas en los países en desarrollo. La vesícula biliar, el hígado, los intestinos y el bazo suelen verse afectados (Fabrega et al., 2015). Las infecciones por *Salmonella* no tifoidea han aumentado durante las últimas 3-4 décadas y, aunque se ha informado de una disminución durante la última década, las infecciones por este patógeno continúan siendo un problema de salud pública importante en muchos países. Estas salmonelas son zoonóticas y las infecciones generalmente se transmiten por los alimentos. Aunque existe un gran número de serotipos de *Salmonella*, el aumento general del número de infecciones se debe a relativamente pocos serotipos y tipos de fagos emergentes, así como a los cambios en la sociedad humana; métodos modernos de agricultura intensificada y producción de alimentos y el comercio global. *Salmonella typhimurium* es resistente a múltiples fármacos como ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina causa infecciones de leves a graves, incluidas infecciones potencialmente mortales.

2.6 GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS VEGETALES

A pesar de que los extractos vegetales representan una alternativa natural, existen algunos inconvenientes en cuanto a su uso, los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas de alcaloides, triterpenos, cumarinas, lactonas, glicósidos cardioactivos y cianogénicos, saponinas, entre otros que pueden tener propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Nunes et al., 2012).

Para evaluar la seguridad en su uso y/o consumo se realizan estudios de genotoxicidad y citotoxicidad. La genotoxicidad puede denominarse el posible daño genético además de efectos biológicos adversos (Holmberg et al., 2001). El daño

genético se precisa en términos de lesiones estructurales que ocurren en el ADN (Valencia et al., 2014) entre los principales se encuentran

- 1) Mutagenesis: se refiere a cambios puntuales en los genes, los cuales ocurren en la secuencia de bases del ADN dentro de un gen.
- 2) Clastogénesis: se refiere a cambios en la estructura cromosómica, que resulta en la ganancia, pérdida o arreglos de los cromosomas.
- 3) Aneuploidíae: refiere a la ganancia o pérdida de cromosomas intactos

Por otro lado, la citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado y es uno de los indicadores más importantes para la evaluación biológica en estudios *in vitro*. Para determinar la muerte celular causada por estos daños, es necesario ensayos fiables y reproducibles a corto plazo de citotoxicidad y viabilidad celular. Los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular se basan en diversas funciones celulares. Un amplio espectro de ensayos de citotoxicidad se usa actualmente en los campos de toxicología y farmacología (Aslantürk, 2018). Los ensayos de citotoxicidad y/o viabilidad celular *in vitro* tienen algunas ventajas, como la velocidad, el costo reducido y el potencial de automatización, y las pruebas que utilizan células humanas pueden ser más relevantes que algunas pruebas en animales *in vivo*. Es importante saber cuántas células viables quedan y/o cuántas células están muertas al final del experimento para así saber el impacto que ocasiona a lo que se expone la célula y considerar si hay relación significativa. La toxicidad es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él. Tóxico es una sustancia que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo, tanto animal como vegetal (Jiménez 2009).

2.6.1 MÉTODOS PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD

Las pruebas de genotoxicidad permiten detectar compuestos que inducen daño genético, directa o indirectamente, y son necesarios antes de que se produzca la exposición en el ser humano (Hernández et al. 2011). La evaluación genotóxica de

extractos de plantas medicinales debe ser realizadas en primera instancia, mediante ensayos *in vitro* como pueden ser; aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos y electroforesis de una célula (Lodish et al. 2005).

Las aberraciones cromosómicas se caracterizan por cambios en la estructura cromosómica o en el número total de cromosomas; esto puede ocurrir espontáneamente o como resultado de la exposición a agentes físicos o químicos (Russel P.J. 2002). Dichas aberraciones se pueden producir a través de mecanismos clastogénicos y aneugénicos. Los primeros se caracterizan por la inducción de rupturas cromosómicas durante la división de la estructura celular, mientras que los segundos comprenden la alteración de estructuras celulares, tales como el huso mitótico, lo cual conlleva pérdidas cromosomales lo cual puede inducir micronúcleos (Fenech, 2000).

Los micronúcleos (MN) son masas de cromatina que tienen forma de pequeños núcleos y que aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas. Los MN están envueltos por una membrana nuclear, similar a la del núcleo de la célula hija, sin embargo, su tamaño es muy pequeño en comparación a éste (Zalacain 2005). Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso puede producirse equívocamente debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, roturas cromosómicas, efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas; lo que trae como consecuencia, pérdida cromosómica y que el reparto del material genético no sea equitativo (Zalacain et al. 2005). Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómeros no serán incluidos en los núcleos hijos. Los micronúcleos pueden resultar de fragmentos acéntricos (agente aneugénico) o cromosomas totales (agentes clastogénicos); estos pueden incorporarse o no al núcleo principal durante el ciclo celular (Fenech M. 2000). Un MN de tipo clastogénico se forma después de que el ADN ha sufrido daño, como puede ser el rompimiento de doble cadena, que si no es reparado adecuadamente da como resultado el arreglo asimétrico de cromosomas e intercambio de los

mismos. Por otro lado, los MN de tipo aneugénico se forman por deficiencias en la segregación cromosómica durante anafase, usualmente causada por fallas en el huso mitótico, daño en el cinetocoro, y alteraciones en la regulación del ciclo celular (Mateuca et al. 2006).

Intercambio entre cromátides hermanas (ICH). La ruptura y posterior unión de las cromátides de un cromosoma en la estructura de su “hermana” es conocida como Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH o SCE, Sister Chromatid Exchange) y puede darse ya sea entre cromátides hermanas de una tétrada meiótica o entre las de un cromosoma somático duplicado. En este caso, el corte y unión del ADN produce dos moléculas idénticas, ya que una es copia de la otra y se encuentran unidas en el mismo punto, el intercambio no entraña ningún cambio en la disposición de los genes, tampoco hay efecto alguno sobre el fenotipo de la progenie, en realidad se puede decir que demuestra que los mecanismos intracelulares de reparación del ADN están funcionando correctamente; este tipo de corte y unión es solamente identificable por métodos especiales que marquen el ADN durante su duplicación (Solari, 2004, Eynard, 2008).

El bioensayo cometa, también conocido como electroforesis alcalina de células individuales (del inglés: Single Cell Gel Electrophoresis Assay), es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos (Kassie et al. 2000). La electroforesis de células individuales o ensayo cometa es una prueba rápida, de bajo costo y con una sensibilidad que supera en más de 100 veces a las pruebas citogenéticas y que permite detectar roturas de simple cadena y sitios lábiles a los álcalis. Este ensayo puede ser aplicado a cualquier célula eucariótica y permite el análisis del daño genético al nivel de células individuales.

Existen diversos estudios sobre la actividad genotóxica de extractos vegetales, (Juárez, 2017, Jiménez, 2009; Sponchiado, 2015, Fatma et al., 2018; Leme y Marín-Morales, 2009; Sommaggio et al., 2018) aunque existen diversos biomodelos para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad uno de los más utilizados es *Allium* sp (Ghosh et al., 2017; Pérez et al., 2017).

En los últimos años, el uso de plantas para el biomonitoreo de agentes genotóxicos en el ambiente ha tenido un fuerte incremento, ya que éstas son buenos indicadores de efectos citogenéticos y mutagénicos de diversos contaminantes ambientales, Las plantas juegan un papel importante como bioindicadores y son las que al modificar su estructura o función, pueden presentar sensibilidad a los cambios ambientales y reaccionar ante ellos como estímulos, las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser organismos eucarióticos, y por lo tanto más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores (Gopalan,2012, Petriccione et al. 2013). La especie *Allium* posee características cromosomales que favorecen la evaluación de aberraciones cromosómicas, es un método eficaz, rápido, de bajo costo, con resultados extrapolables debido a que los cromosomas de animales y plantas tienen estructuras similares. De acuerdo con diversos autores Bagatini et al. (2007) Lubini et al., (2008) Trapp et al., (2020) la prueba con *Allium spp.* es un biomodelo adecuado para identificar efectos citotóxicos y genotóxicos de diversas plantas

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

Se presenta la estructura de la tesis en un diagrama de flujo que explica las fases en las cuales se realizó el estudio, en la primera fase se realizó el estudio etnobotánico. En la segunda fase las pruebas antimicrobianas *in vitro* e *in vivo*, y la evaluación de los metabolitos del extracto vegetal con mayor actividad antimicrobiana, en la tercera fase estudios genotóxicos y citotóxicos, finalmente se realizó un ensayo experimental evaluando el extracto vegetal con cepas del laboratorio de Microbiología de los Alimentos y del medio ambiente de la Universidad de Jaén, España (figura 5)

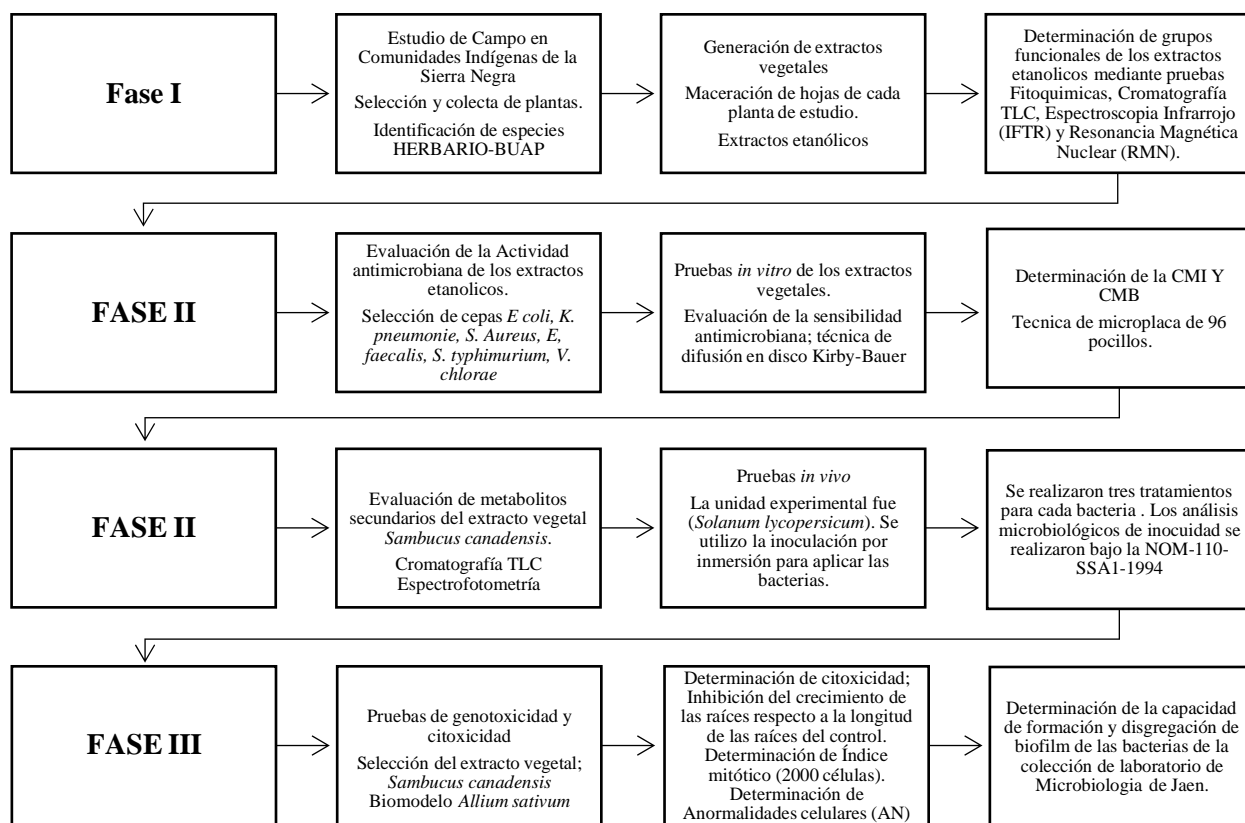


Figura 5. Diagrama de flujo del diseño metodológico de cada fase experimental.

3.1 FASE I

3.1.2 ESTUDIO ETNOBOTÁNICO Y SELECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES

El estudio se desarrolló en la región de la Sierra Negra de Puebla, en el municipio de San Miguel Eloxochitlan y comunidades aledañas; Atexacapa, Mirador, Macuilcouthitla, Zacacoapan, Tepepa, Macuiltepec (figura 6). El municipio se ubica en las coordenadas 18°30'32"N y 96°55'22"O a 90 kilómetros del valle de Tehuacán, colinda al norte con el estado de Veracruz, al sur con el municipio de Zoquitlán, al este con el municipio de Porfirio Díaz y al oeste con el municipio de Ajalpan. Tiene una extensión de 190 km². Su índice de marginación es de 2.26, lo cual lo ubica en el segundo municipio con mayor marginación del estado (CONAPO, 2010). Se estima que más de 9000 habitantes hablan una lengua indígena y que 44% de la población es indígena (SEDESOL, 2012). El clima es templado húmedo con lluvias todo el año, presenta una vegetación de bosques mesófilos de montaña, y pinos y en lo que es el declive hacia la planicie costera la vegetación es selva alta perennifolia

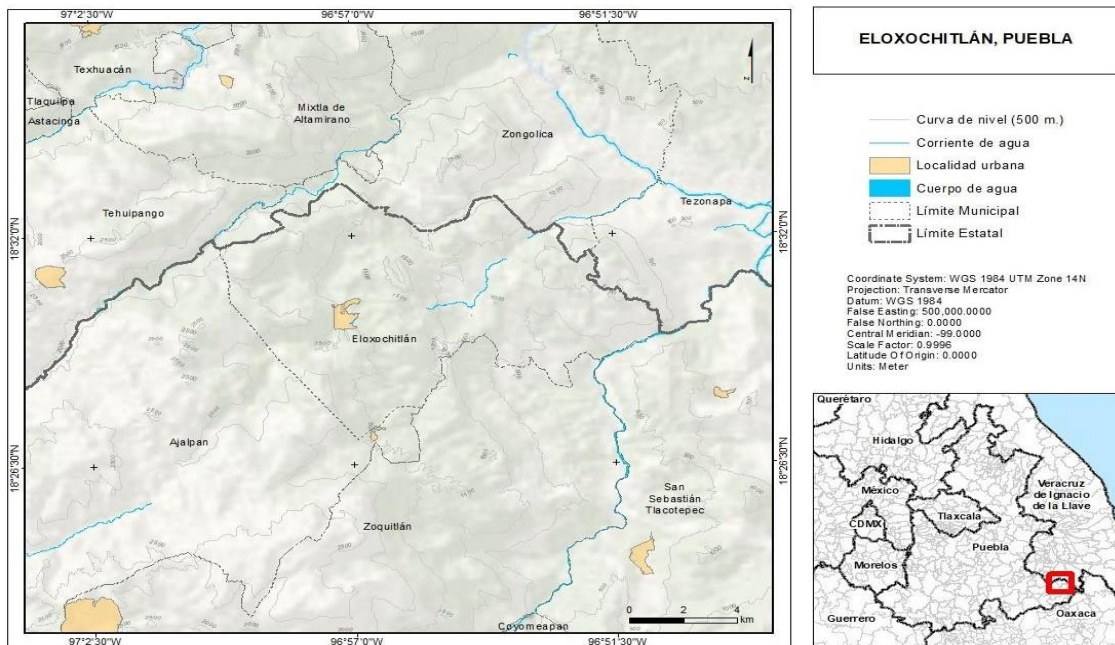


Figura 6. Mapa de localización de la comunidad de San Miguel Eloxochitlan y comunidades aledañas.

Los criterios de selección en cuanto a las localidades fueron homogeneidad en características ecológicas y socioculturales. Se trabajo con hombres y mujeres adultos y algunos jóvenes debido a que ellos son los que poseen mayor conocimiento en el uso de plantas. El tipo de investigación que se realizó en esta etapa fue de tipo cualitativa y cuantitativa en el cual se encuestó a un total de 635 personas empleando un cuestionario con validación de alfa de cronbach de 0.8 en el que se incluye una parte demográfica y en una segunda parte se considera información herbolaria. En la segunda parte se incluyó información sobre el material herbolario: plantas utilizadas, la forma de obtención, forma biológica, parte de la planta utilizada, enfermedades para las cuales las utilizan y forma de preparación. Asimismo, con los datos recopilados se obtuvieron los índices de valor de uso (VUis) y frecuencia de uso (Fuso), de acuerdo con Toscano (2006) el índice de valor de uso significa la importancia que posee una especie dada según el grado de uso de la misma y comparada con otras especies.

$$VU_{is} = \sum \frac{\text{frecuencia de la especie}}{\text{Valor max de la especie mas utilizada}}$$

VUis = es el índice de valor de uso de la especie is. Este índice varía entre 0 y 1, siendo 1 la especie con mayor valor de uso.

Frecuencia de uso. Se refiere a las veces en que una especie es utilizada por un usuario (Bravo *et al.*, 2017):

$$F_{uso} = \frac{N^{\circ} P}{N^{\circ} e \times 100}$$

Fuso = frecuencia de uso de la planta medicinal.

N° p = número de veces en la cual se mencionó la especie.

N°e = número total de entrevistas realizadas

Con la información obtenida se realizó un listado de plantas utilizadas y éstas fueron identificadas por comparación visual con datos de herbarios, manuales, diccionarios botánicos y artículos científicos. Las plantas seleccionadas para este estudio fueron colectadas e identificadas en el jardín botánico de la BUAP. Asimismo, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva en los buscadores SciFinder y PubMed para investigar estudios realizados sobre actividad antimicrobiana y genotóxica de las plantas de estudio.

3.2 FASE II

3.2.1 ELABORACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

En la fase II del presente proyecto se seleccionaron y colectaron las plantas seleccionadas: *Sambucus canadensis*, *Salvia microphylla*, *Ricinus communis* y *Bidens alba*, de estas plantas se colectaron entre 1000 y 500 g de hojas de cada especie vegetal. Las hojas fueron secadas a la sombra y posteriormente el material vegetal se colocó en un matraz Erlenmeyer con 4L de etanol al 96% y se dejaron reposar durante tres días, transcurrido ese tiempo se filtraron con papel filtro del no. 4 y posteriormente se procedió a depositar el material vegetal nuevamente en el solvente y se realizó nuevamente el filtrado, este proceso se realizó para cada planta, una vez realizado el doble filtrado se procedió a realizar la evaporación los extractos etanolicos en un rotavapor marca Büchi a presión reducida a 35 ± 15 °C (figura 7 y 8). Los extractos etanolicos fueron evaporados en una campana de vacío hasta su completa sequedad. Se obtuvo el rendimiento de los extractos vegetales utilizando la fórmula:

$$\text{Rendimiento: } \% \text{ PEPI} \times 100$$

Donde: PE: Peso obtenido después de la extracción

PI: Peso inicial del material vegetal a extraer



Figura 7. Maceración de las hojas de los extractos vegetales en el disolvente etanol.



Figura 8. Proceso de extracción con el rotavapor marca Buchi. Laboratorio de Biotecnología Ambiental UPAEP.

3.2.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

3.2.3 PRUEBAS FITOQUÍMICAS

Las pruebas fitoquímicas permiten determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y orientar la extracción y/o el fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados que van en función de la polaridad de los principios activos que se desean extraer y la aplicación de reacciones de coloración. De acuerdo con Sharapin (2000) los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen una adecuada orientación y deben ser interpretados en conjunto con otras pruebas cualitativas (Bañuelos-Valenzuela et al., 2018). En este sentido, para la identificación cualitativa de los diferentes grupos de metabolitos, se realizaron diferentes pruebas con métodos estándar con ligeras modificaciones (Gamboa et al., 2018; Patil et al., 2014).

En este estudio se utilizó el disolvente diclorometano y etanólico, y de acuerdo con la literatura respecto al solvente de mayor efecto se procedió a trabajar con extractos etanólicos. Para reconocer la presencia de cumarinas se utilizó la prueba de Baljet, para triterpenos y esteroides la prueba de Liebermann-Burchard, para saponinas la prueba de la espuma y Rosenthaler, los taninos fueron evaluados con la prueba de gelatina y Cloruro férrico, Glucósidos cianogénicos con la prueba de

Grignard, los flavonoides con las pruebas de Shinoda, Pew's, NAOH, alcaloides con Dragendorff, Mayer y Wagner, cada prueba se realizó por triplicado (figura 9). Los resultados de cada prueba fueron evaluados de acuerdo a la intensidad; nula (-) baja (+) mediana (++) alta (+++). A continuación, se detalla la metodología utilizada, así como los reactivos necesarios para realizar cada prueba:

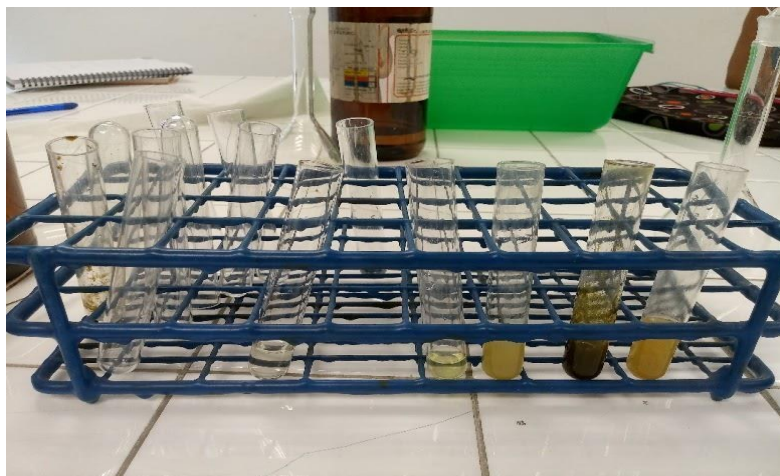


Figura 9. Pruebas fitoquímicas de cada extracto vegetal.

Alcaloides: el extracto etanólico se disolvió en HCl diluido, se agitó y filtró hasta que el filtrado era completamente transparente. El filtrado se ensayó con los reactivos para alcaloides: Mayer, Dragendorff y Wagner. El reactivo de Mayer se preparó con 1.36 g de cloruro mercúrico (HgCl_2) en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio (KI) en 10 ml de agua, se juntan las dos soluciones y se aforan a 100 ml con agua. El Reactivo de Dragendorff se preparó con 8.0 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico (densidad 1.18 g/ml, o sea, al 30 %) y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 ml. Finalmente para el reactivo de Reactivo de Wagner se disolvieron 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de KI en 20 ml de agua y la solución se aforo con agua destilada a 100 ml. Se consideraron positivas las pruebas en las que apareció un precipitado.

Saponinas: para la prueba de la espuma en un tubo de ensaye se mezcló una porción de la muestra con agua caliente y se agitó vigorosamente por algunos

minutos. La formación de espuma estable con apariencia de panal por unos minutos se considera positiva. La prueba de Rosenthaler, para esta prueba se añadió una gota del reactivo de Rosenthaler para lo cual se diluye 1 g de vainillina en 100 ml de etanol, a este reactivo se le añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan color violeta. Para la prueba de Triterpenos; se disolvió una porción de la muestra en 1 ml de cloroformo, se agregó 1 ml de anhídrido acético resbalando por las paredes del tubo y se dejó reposar en frío. La aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase, al añadir 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se considera positiva.

Taninos: se disolvió en cloroformo una porción de la muestra, se filtró y se tomaron alícuotas de 1 ml para las pruebas con cloruro férrico y con reactivo de gelatina. En ambos casos se considera positiva la aparición de un precipitado. Los taninos hidrolizables y condensados se diferencian según el color o precipitación con sales férricas; los hidrolizables dan coloración y precipitados azul-negruzcos y los condensados dan precipitados pardo-verdosos.

Para flavonoides se utilizó la prueba de Shinoda, a un tubo con el extracto diluido se le agregaron un trocito de viruta de magnesio amalgamado y unas gotas de HCl concentrado. La aparición de colores del rojo profundo al magenta indica la presencia de una flavonona o dihidroflavonol. Las dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionan. También se realizó la prueba de Pew's. para lo cual a un tubo se le agregó el extracto diluido se le agregaron polvo de zinc y unas gotas de HCl 5N. Sólo los dihidroflavonoides reaccionan para dar colores que van del rojo púrpura al rojo cereza. Flavononas, dihidrochalconas y otros flavonoides dan coloración rosa o café. Además, se realizó la prueba de hidróxido de sodio, en un tubo al extracto diluido se le agregaron unas gotas de NaOH diluido. La aparición de colores amarillo o naranja se considera indicativa de la presencia de flavonoides. Para glucosidos cianogénicos; se colocó una tira de papel impregnado con reactivo de Grignard en la boca de un tubo que contenía una pequeña cantidad del extracto clorofórmico con unas gotas de cloroformo. Se calentó entre 30 y 35° C y se observó la coloración que apareció en el papel. Un color rojo o rosa se considera positivo. La prueba de Grignard fue realizada con 1 g de carbonato de sodio con 100 mg de

ácido pícrico y se aforo a 100 ml con agua. El ensayo de Baljet: permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para realizar el reactivo se preparan dos soluciones que, al mezclarse, constituyen el reactivo. Para la solución A, 1 g de ácido pícrico se aforo a 100 ml con etanol; para la solución B, 10 g de hidróxido de sodio se aforan a 100 ml con agua dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar la cual, si no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y disolverse en la menor cantidad. En estas condiciones se adiciona 1 mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo respectivamente

El ensayo de Liebermann-Burchard: Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo disolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración: rosado-azul muy rápido, verde intenso-visible, aunque rápido, verde oscuro-negro-final de la reacción (figura 10).



Figura 10. Formación de espuma en la prueba de Saponinas de uno de los extractos vegetales evaluados.

3.2.4 CROMATOGRAFÍA

En este trabajo se utilizó cromatografía para analizar los extractos vegetales, este método permite separar los componentes individuales puros de una mezcla para determinar la proporción de estos componentes. En la cromatografía las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas. Las separaciones se obtienen al introducir compuestos orgánicos en una fase estacionaria y dejando luego que una fase móvil fluya a través de la mezcla. Los componentes unidos con menos fuerza a la fase estacionaria y más soluble en la fase móvil recorren una distancia mayor que los demás componentes (Bruneton, 2011). Hay distintos tipos de cromatografía; en papel, de capa fina, de columna, Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) y la GC (Cromatografía Gaseosa). En este estudio se utilizó la cromatografía en papel y de capa fina.

3.2.4.1 CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

La fase estacionaria está formada por una tira de papel de filtro. La muestra para analizar se coloca en forma de gota sobre un extremo del papel. Luego se sumerge la tira de papel en un recipiente donde se encuentra la fase móvil, teniendo en cuenta que el extremo donde está colocada la muestra quede en la parte de abajo del papel. La fase móvil asciende por capilaridad arrastrando consigo la muestra y separando cada componente según su afinidad por la fase estacionaria. Este tipo de cromatografía se emplea principalmente cuando cada componente de la muestra tiene un color diferente, entonces se puede ver el despliegue de colores sobre el papel para identificarlos, además se revela con luz UV (figura 11 y 12).



Figura 11. Técnica de cromatografía en papel, tomado de Anderson y Martínez; experimentos de Química Orgánica, 2013.

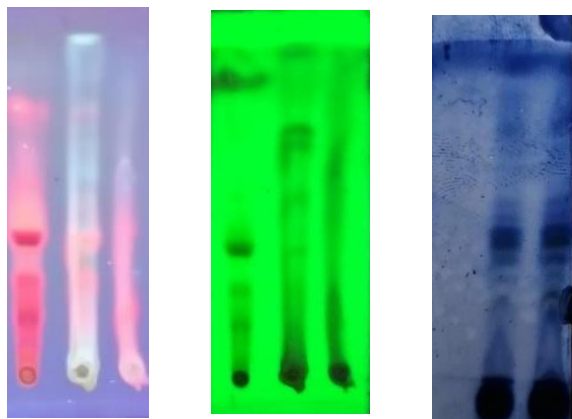


Figura 12. Resultados de la prueba en cromatografía en papel, se muestran los revelados en luz UV larga y corta y en yodo.

3.2.4.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

En esta técnica la fase estacionaria se construye depositando una resina polar (casi siempre sílica gel), sobre una placa de vidrio o aluminio. Se coloca cierta cantidad de la muestra a 1cm del borde inferior de la placa. Luego se sumerge esta placa, teniendo en cuenta que el extremo que contiene la muestra debe quedar hacia abajo, en un recipiente que contiene la fase móvil. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. Los requisitos esenciales son: un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. (García y García, 2013).

En este estudio se siguió el método de Wagner y Bladt (2001) con ligeras modificaciones, se emplearon cromatoplas Merck de sílica gel HF254 de 0,3 mm de espesor; como fase móvil hexano-acetato de etilo (AcOEt) (5:1), las placas fueron observadas bajo luz UV Lamp, P/N 95-0279-0, a las longitudes de onda de 254 y 365 nm para observar el número de compuestos fluorescentes.

Posteriormente, se utilizó un agente revelador a base de molibdato pentahidratado, para los compuestos que no absorben la luz ultravioleta (Figura 13).

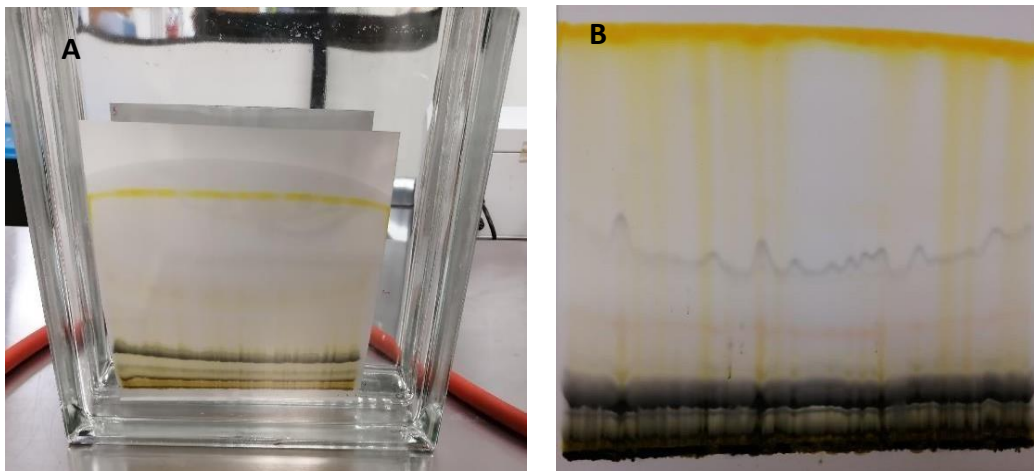


Figura 13. Proceso de Cromatografía en capa fina TLC, a) muestra del extracto en placa dentro de la cuba cromatográfica, b) proceso de separación de componentes,

3.3.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Para reconocer los grupos funcionales se utilizó espectroscopía de infrarrojo (FTIR) en un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker en el rango 4000-600 cm^{-1} . Los análisis se realizaron en el departamento de CESAT, Upaep. La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier permite evaluar los cambios vibracionales de grupos funcionales (Dominguez-Perez et al., 2019). Es una herramienta útil para el análisis cualitativo y cuantitativo de muestras complejas, sin la necesidad de etapas previas de separación, proporcionando un mapeo de la composición química y estructural de los mismos (Fareez, 2015; Gallignani et al., 2008) (figura 14).

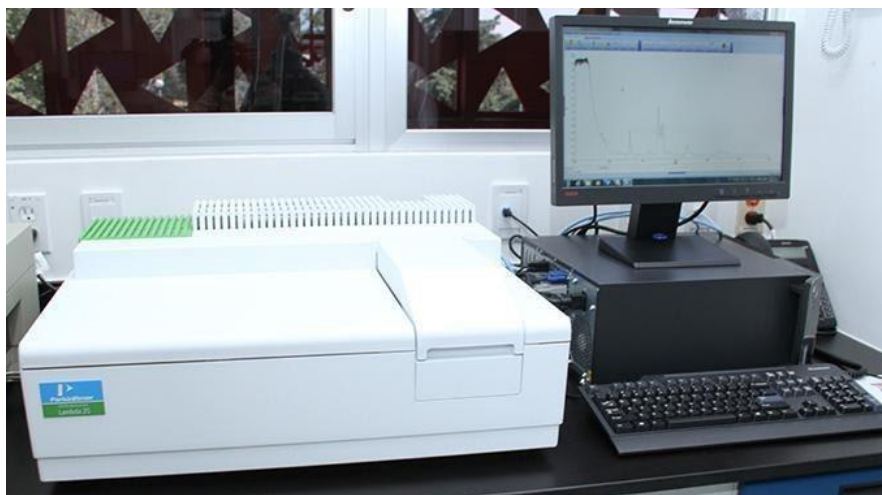


Figura 14. Análisis de las muestras en el espectrofotómetro en laboratorio de CESAT, UPAEP.

3.4.1 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana son de gran importancia debido que proveen la información necesaria para conocer la actividad biológica de las especies vegetales utilizadas en este estudio. La actividad antibacteriana de los extractos vegetales ha revelado el potencial de las plantas superiores frente a distintos patógenos (Chiavari-Frederico et al., 2020).

3.4.2 MICROORGANISMOS

Se seleccionaron 7 cepas de importancia significativa en los alimentos; *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 19433), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) *E. coli* (ATCC 25922) obtenidas del cepario del Departamento de Biotecnología de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla y 2 cepas *Salmonella enterica serovar Typhimurium* ATCC 19430, *Vibrio Chlorae* ATCC 17802 las cuales fueron donadas del laboratorio de Salud de Puebla (Tabla 2).

Tabla 2. Nombre tipo y clasificación de las bacterias utilizadas en este estudio.

Bacteria	ATCC	Clasificación
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	Gram negativa
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram negativa
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram positiva
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	Gram positiva
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 19430	Gram negativa
<i>Vibrio Cholerae</i>	ATCC 17802	Gram negativa

3.4.3 AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS

Para realizar este proceso de aislamiento de la cepa de referencia se tomó una muestra (figura 15) la cual se ajustó con un nefelómetro a 0.5 escala de Mc Farland o su equivalente 10^6 UFC mL⁻¹ con el fin de formar unidades de colonias se realizaron aislamientos por medio de la técnica de agotamiento por estría cruzada en placa, empleando asas redondas y esparciendo la bacteria se sembró en cajas petri con sobre el agar Mueller-Hinton



Figura 15. Bacterias utilizadas en este estudio Gram + y Gram -.

3.4.4 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA; MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos (García et al, 2000). Se utilizó el método de difusión en agar el cual es una prueba en la que se enfrenta la bacteria, inoculada sobre la superficie de un medio con agar, a una solución antibiótica absorbida en discos de papel filtro. En este estudio la suspensión bacteriana se preparó ajustándose el inóculo a la concentración correspondiente a 0,5 de la escala de Mc Farland con el Nefelómetro o su equivalente óptico 10^{-6} UFC mL⁻¹. Posteriormente se colocaron sobre una placa de agar sólido Mueller Hinton 100 µL de la suspensión bacteriana (Britania, Argentina) utilizando hisopos de algodón estériles. Se utilizaron discos de papel filtro (6 mm de diámetro, Whatman # 1). impregnados con 40 µL cada extracto vegetal, como control negativo se utilizaron 40 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) y como control positivo se utilizaron discos de gentamicina comerciales (10 µg, Britania, Argentina). Las placas se incubaron en estufa a 37° C por 24 h, transcurrido este tiempo se determinó el diámetro de la zona de inhibición (mm). Considerando como inhibición del crecimiento los halos mayores a 6 mm correspondientes al diámetro estándar de los sensidiscos utilizados. Las observaciones se realizaron por duplicado. Las placas se incubaron en estufa a 37° C por 24 h (figura 16).

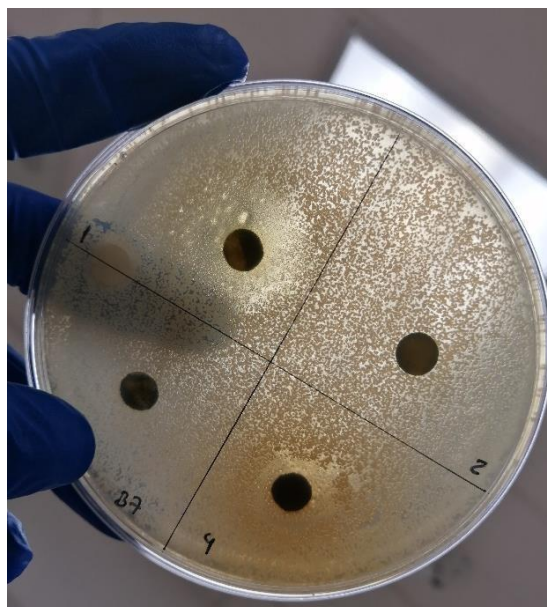


Figura 16. Prueba de sensibilidad bacteriana método de difusión en disco.

3.4.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Los métodos de dilución son los más utilizados para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). La menor concentración de antibiótico ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe el desarrollo de la bacteria se conoce como la concentración mínima inhibitoria (Gamazo, 2005, p. 127). En este estudio después de realizar la evaluación de la sensibilidad bacteriana, se evaluó la CMI en una microplaca de 96 pocillos se depositó una alícuota de $150 \mu\text{L}$ de medio de cultivo, más $20 \mu\text{L}$ de cada cepa ajustado a 0.5 escala de Mc Farland o su equivalente 10^6 UFC mL^{-1} más $30 \mu\text{L}$ de cada extracto etanólico se hicieron diluciones seriadas en rangos de concentración de 125 a $1000 \mu\text{g/ml}$, todas las microplacas se incubaron 24 h a 37°C . se midió la absorbancia con un lector de microplacas ELISA a 570 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de CMI corresponden a la concentración donde la D.O. era igual al del inóculo inicial después de incubación por 24 horas bajo condiciones estandarizadas (Yoon et al., 2014) (Figura 17). Posteriormente se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), para matar el 99% del

inóculo inicial después de incubación por 24 horas bajo condiciones estandarizadas. Se utilizaron cajas Petri en agar nutritivo utilizando diferentes concentraciones 125, 250 y 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ incubando por 24 horas a 37°C . El crecimiento se determinó cualitativamente como (-) Negativo, (+) Poco, (++) Medio y (+ + +) abundante.

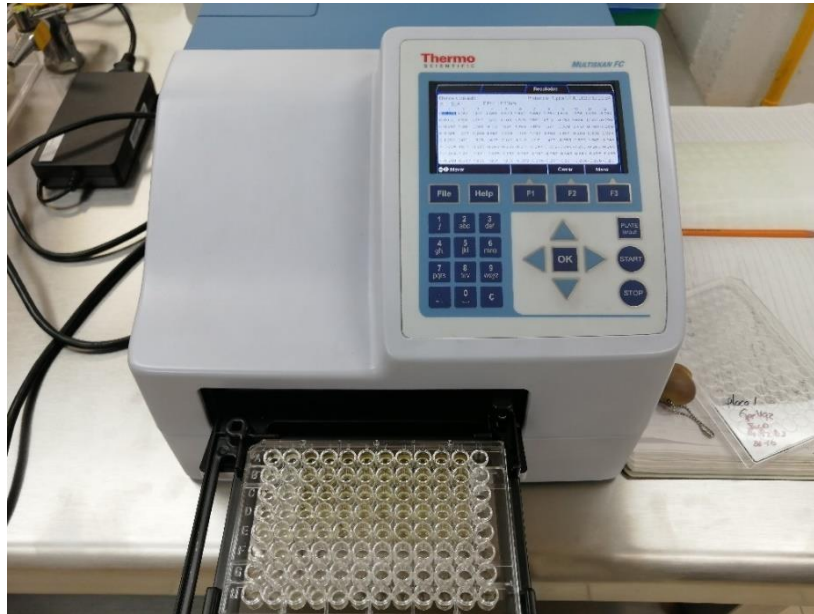


Figura 17. Microplaca de 96 pocillos y lector de microplacas para determinar la Densidad óptica (DO).

3.5 PRUEBAS *IN VIVO*

La unidad experimental fueron tomates (*Solanum lycopersicum*) una de las hortalizas con mayores problemas de inocuidad por la presencia de microorganismos patógenos (Ocaña et al., 2015). Las muestras fueron colectadas de dos supermercados locales del Estado de Puebla.

Las bacterias de estudio se incubaron en medio nutritivo (Bioxon de México) 24 h a 37°C hasta alcanzar una D.O de 0.5 Mc Farland. Para este estudio se utilizaron las concentraciones a las cuales se encontró mayor efecto antimicrobiano 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de acuerdo a las pruebas en microplaca.

Se utilizó la inoculación por inmersión por ser la más apropiada para el proceso de inoculación (Beuchat et al., 2003; Tornuk et al., 2011) mediante este método a los

tomates se les aplicaron las diferentes bacterias patógenas. Posteriormente, se les aplicaron los extractos mediante el método de aspersion (5 ml), después de 24 h, nuevamente se aplicaron los extractos por el mismo método (Luna-Guevara et al., 2015; López et al., 2006). Se realizaron tres tratamientos para cada bacteria patógena (6) y cada extracto (4); T1 (tomate + bacteria); T2 (tomate + extracto + bacteria); T3 (tomate sin bacteria y sin extracto), con tres repeticiones cada uno (figura 18).

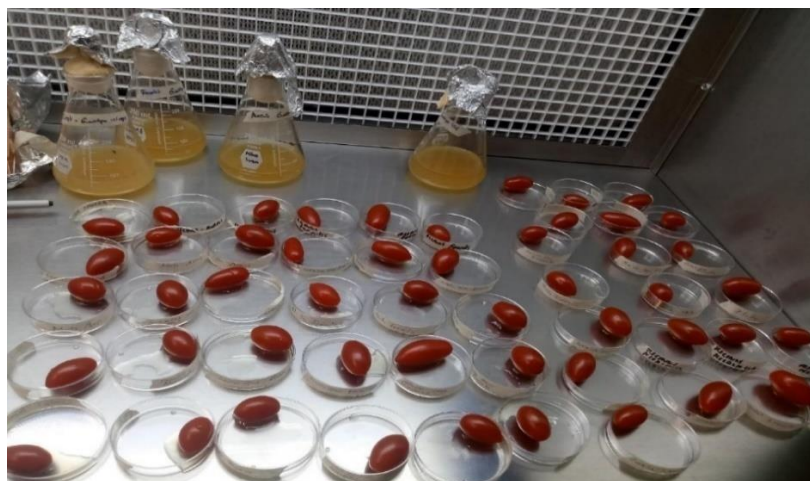


Figura 18. Pruebas *in vivo* utilizando el biomodelo *Solanum lycopersicum*.

3.5.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los análisis microbiológicos de inocuidad se realizaron después de 24h del procedimiento anterior, para la preparación de las muestras se utilizó el método microbiológico, regido por la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 Bienes y Servicios. “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”. El fruto completo fue homogeneizado en una licuadora marca (Osterizer). Un mL de este se diluyó en 9 mL de agua peptonada salina esteril (0,1% peptona + 0,85% NaCl). De la muestra compuesta se 1 mL de esta mezcla y se diluyó en 9 mL de agua peptonada esteril, así se realizaron diferentes diluciones desde 10^0 hasta 10^4 y se sembró de forma directa en los diferentes medios de cultivo para cada microorganismo. Posteriormente se realizaron las pruebas de calidad

para mesófilas totales y Enterobacterias siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994). Esta Norma fue establecida por el gobierno mexicano para establecer políticas que promuevan y regulen la instrumentación de sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) en las unidades de producción y procesamiento primario de origen agrícola. La Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) es el encargado de los aspectos sanitarios y de inocuidad en la producción agroalimentaria (SAGARPA, 2016).

Una vez preparadas las diluciones de las muestras la determinación de bacterias mesófilas aerobias se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, se empleó la técnica de vertido en placa. Para ello se tomó una alícuota de 1000 µl de cada dilución y se colocó en el centro de una placa Petri estéril, posteriormente se agregaron de 25 a 30 mL de agar para cuenta estándar (BIOXON). Fundido y mantenido a 45 °C, se mezcló mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Se incubaron las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron todas las colonias. Cada muestra se plaqueó por duplicado; además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo. Para la determinación de coliformes totales una vez realizadas las diluciones se siguió la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, se emplearon las técnicas de siembra por vertido en placa y la de doble capa de agar. Se transfirieron alícuotas de las diluciones de la muestra a placas de Petri estériles y posteriormente se agregaron de 15 a 20 mL de agar Bilis Rojo Violeta (BRV-marca BIOXON), fundido y mantenido a $45 \pm 1,0$ °C se mezcló mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Posteriormente se añadieron cuatro mL del medio RVBA a $45 \pm 1,0$ °C en la

superficie del medio inoculado. Se incubaron las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. Cada muestra se plaqueó por duplicado, además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo. Después del periodo especificado para la incubación, se evaluó cuantitativamente el número de unidades formadoras de colonias (UFC) (figura 19)

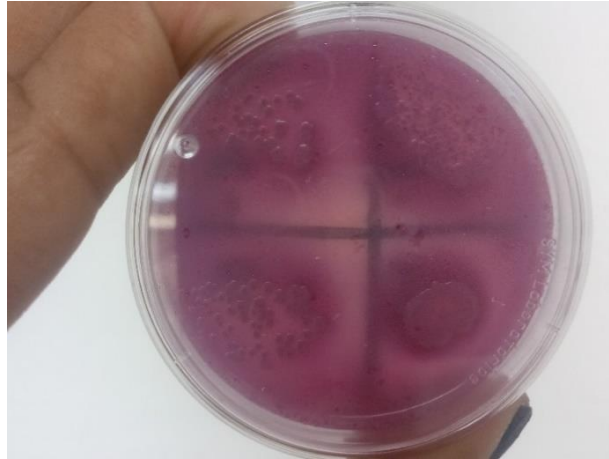


Figura 19. Crecimiento de bacterias en agar Bilis Rojo Violeta (BRV).

3.5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba de ANOVA para comparar los efectos de las concentraciones de cada bacteria por extracto, y la prueba pos hoc de Tukey, para conocer diferencias entre los tratamientos. Para conocer los efectos e interacciones entre los tratamientos se utilizó un ANOVA factorial de 3 niveles con 4 factores; extracto, bacteria, concentración, teniendo como variable de respuesta la D.O. Para las pruebas in vivo se utilizaron los datos de los microorganismos analizados (Mesófilos Aerobios, Coliformes) se reportaron en UFC/mL, y se compararon con los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Esta NOM indica que para Mesófilos Aerobios el LMP debe ser ≤ 150000 UFC/mL. Para Coliformes Fecales, la muestra no debe exceder de 100 UFC/mL se utilizó la prueba de ANOVA de un factor, evaluando el crecimiento UFC/ml para cada extracto, y la prueba pos hoc de Dunnet para conocer diferencias entre tratamientos y control, para considerar diferencias estadísticamente

significativas se utilizó un valor de $p < 0,05$ los análisis se realizaron con el programa estadístico Minitab (licencia para UPAEP).

3.6 PURIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS DEL EXTRACTO *SAMBUCUS CANADENSIS*

De acuerdo con los datos obtenidos sobre actividad antimicrobiana se seleccionó el extracto con mayor actividad antimicrobiana y se evaluó la actividad biológica de cada metabolito del extracto vegetal. Se realizaron pruebas cualitativas; fitoquímicas y cromatografía en capa fina (TLC) siguiendo el método de Wagner y Bladt (2001) y espectroscopía de infrarrojo transformada de Fourier (FTIR) para reconocer los grupos funcionales en un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker en el rango 4000-600 cm^{-1} . Los análisis se realizaron en el departamento de CESAT, UPAEP.

3.6.1 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS DE LOS METABOLITOS DE *SAMBUCUS CANADENSIS*

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada metabolito se utilizó el método de difusión en disco siguiendo la técnica descrita por Bauer (Método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de (NCCLS, 2001). Posterior a esta prueba se determinaron los metabolitos con mayor actividad y se utilizó la técnica microdilución en una microplaca de 96 pozos, todas las microplacas se incubaron 24 h a 37°C, al finalizar este periodo de tiempo se midió la absorbancia con un lector de microplacas ELISA a 570 nm.

3.7 FASE III

3.7.1 PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD EN EL BIOENSAYO *ALLIUM SATIVUM*

La planta seleccionada para evaluar la genotoxicidad fue *Sambucus canadensis* (L.) *Bolli* ID: 83771. Con el extracto etanólico realizado en las etapas anteriores se procedió a realizar las diferentes concentraciones 125, 250, 500, 1000 y 1500 mg/L. Las células meristemáticas de las raíces de *A. sativum* se utilizaron para evaluar las anomalías nucleares (AN) y el índice mitótico (IM) en las concentraciones mencionadas anteriormente se utilizó como control el agua. En cada concentración se realizaron 5 repeticiones, con bulbos de tamaño uniforme (3 cm de diámetro), los bulbos del control permanecieron en agua. Los otros bulbos se transfirieron a las concentraciones durante 120 horas (figura 20).



Figura 20. Exposición de las raíces de *Allium sativum* al extracto vegetal de *Sambucus canadensis*.

Las longitudes de las raíces y tallo se midieron y se examinaron diariamente para detectar anomalías morfológicas visibles; cambios en la consistencia y el color de la raíz, así como presencia de ganchos o torsiones en las raíces como índice de toxicidad general (Çelik y Aslantürk, 2010) (figura 21).

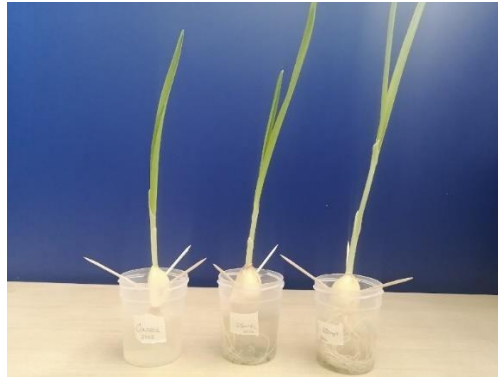


Figura 21. Crecimiento de las raíces de *A. sativum* expuestas al extracto vegetal *Sambucus canadensis*

Finalizado el tiempo de exposición de las raíces al extracto vegetal se cortó la zona meristemática de las raíces de los ajos (2 mm) y se colocaron en un portaobjetos, se hidrolizaron en HCl 1N por 10 minutos (figura 20) posteriormente se lavaron con agua destilada, y se realizó la tinción con aceto orceína, los portaobjetos se fijaron con la técnica de aplastamiento sellando los bordes con resina (figura 21).

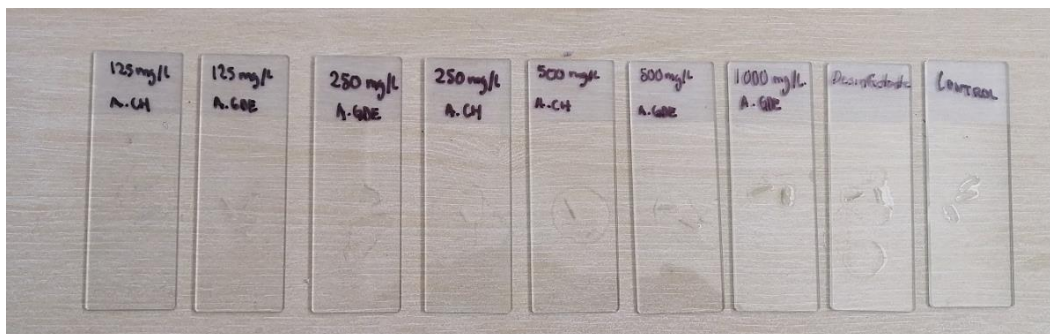


Figura 22. Exposición de las raíces de los ajos (2 mm) en portaobjetos, se hidrolizaron en HCl 1N por 10 minutos.

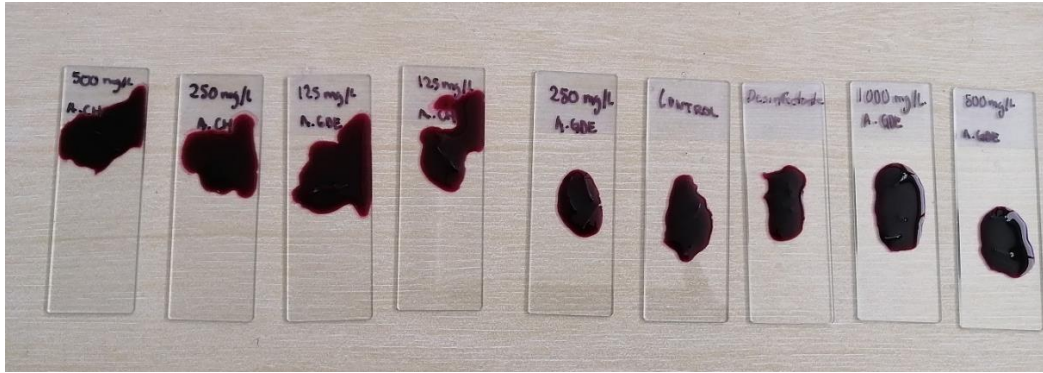


Figura 23. Tinción de las raíces en cada concentración con aceto orceína.

Las muestras se analizaron con un microscopio óptico de fluorescencia Leica DM1000 LED con una cámara digital Jenoptik ProGres C10. Se contaron e identificaron 2000 células meristemáticas para cada tratamiento (figura 24).

En las etapas de mitosis (interfase, profase, metafase, anafase y telofase) se contabilizaron las alteraciones celulares: rotura cromosómica, puentes cromosómicos, cromosomas rezagados, vagabundos, entre otros, con los valores obtenidos se calcularon los índices mitóticos (IM) y el porcentaje de anomalías nucleares (AN) con las siguientes fórmulas:

$$IM = \text{Número de células en mitosis} \div \text{Total de células} \times 100$$

$$AN = \text{Número de células con cromosomas anormales} \div \text{Total de células} \times 100$$



Figura 24. Observación de raíces con un microscopio óptico de fluorescencia Leica DM1000 LED con una cámara digital Jenoptik ProGres C10.

4.1.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de número de raíces y la longitud de raíces y tallo se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). El índice mitótico fue obtenido al sumar el número de células en división en cada fase; profase, metafase, anafase y telofase y fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA), las diferencias encontradas se evaluaron con la prueba *pos hoc* de Dunnet. Las anomalías nucleares: rotura cromosómica, puentes cromosómicos, cromosomas rezagados, vagabundos se evaluaron con la prueba de Chi cuadrada (X^2). Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con valor de $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Minitab 8.1

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FASE I

En la primera fase del estudio se realizaron 635 entrevistas, lo que representa 10% de la población total reportada en cada localidad de acuerdo con los datos del INEGI, 2010. De los entrevistados 79.5% fueron mujeres, con un promedio de edad de 49.5 años, con un mínimo de 18 y máximo de 82 años, el intervalo de edad más frecuente (22.6%) fue de 41-50 años. 20.5% de los encuestados fueron hombres, la edad promedio fue de 58,4 años, con un mínimo de 21 y máximo de 80, el intervalo de edad más frecuente (27.7%) de los encuestados fue de 60-70 años (figura 25). Asimismo, 70% de los informantes mencionaron haber aprendido el uso de las plantas medicinales de sus padres o abuelos.

Se registraron un total de 43 plantas medicinales agrupadas en 21 familias, entre las que sobresalen: Asteraceae, Lamiaceae y Rutaceae. La familia Asteraceae estuvo representada por 8 especies que corresponden a plantas conocidas localmente como manzanilla (*Matricaria recutita* L), hierba maestra (*Artemisia absinthium*), escobilla (*Haplopappus venetus*), estafiate (*Artemisia* sp), árnica (*Arnica montana* L), cempazuchitl (*Tagetes erecta*), santa maria (*Tanacetum parthenium*) y asomiate (*Senecio salignus*). La familia Lamiaceae por 4 especies; hierba buena (*Mentha piperita*), romero (*Rosmarinus officinalis*), mirto (*Salvia microphylla*) y orégano (*Origanum vulgare*). La familia Rutaceae estuvo representada por 4 especies; ruda (*Ruta graveolens*) naranja; (*Citrus x sinensis*) limón (*Citrus x limón*) y lima (*Citrus x aurantifolia*). Las familias restantes están representadas por dos o una sola especie (Tabla 1). Las plantas utilizadas con mayor frecuencia fueron: manzanilla (*Matricaria recutita* L) hierba buena (*Mentha x piperita*) ruda (*Ruta graveolens*) hierba maestra (*Artemisia Absinthium* L) epazote (*Dysphania ambrosioides*) y sábila (*Aloe barbadensis*). De acuerdo con las entrevistas, a estas especies se les atribuyen propiedades curativas para el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades del sistema, así como analgésico, desinflamante y dolor. Los padecimientos para los que se utiliza el mayor número de especies son para enfermedades del sistema digestivo como dolor de estómago, desparasitante,

diarrea, cólicos (Tabla 3). La frecuencia de uso más alta correspondió a la manzanilla (*Matricaria recutita*) seguida de las especies *Mentha x piperita* y *Ruta graveolens*, con valores de 11.6, 10.7 y 8.9 respectivamente. En cuanto al valor de uso de las especies medicinales, la manzanilla y la hierba buena tuvieron los índices más altos y los más bajos lo compartieron 4 especies con valor de uso de 0.01. Asimismo, del total de especies reportadas el 27.9% son endémicas. Respecto a la forma de obtención; 38% son conseguidas de forma silvestre 30.3% la compran y 31.7% la siembran. Los tipos biológicos de las especies que componen la herbolariamedicinal, 58.1% fueron herbáceas, 20.9%, arbóreas y arbustivas. Referente a la ubicación de las especies curativas, 65% de ellas se encuentran en huertos familiares, seguido de los acahuales 19% (zona de transición entre la selva y los terrenos agrícolas donde la vegetación surge de manera espontánea) y potreros 16%. Las partes más utilizadas de las plantas son las hojas (55%) las flores (25%), frutos (12%) corteza y tallo (8%). Las comunidades que mostraron mayor conocimiento basándose en la frecuencia del uso de plantas fue San Miguel Eloxochitlan (41.5%) seguido de Zacacoapa (19.5%) Mirador (13.2%) Macuiltepec (10%) Macuicoutitla (5.8%) y Atexacapa (3.8%). En cuanto a la forma de preparación utilizan la técnica de maceración (30.2%), cocimiento (28.3%), infusión (26%) y tintura (15.5%) (figura 26)

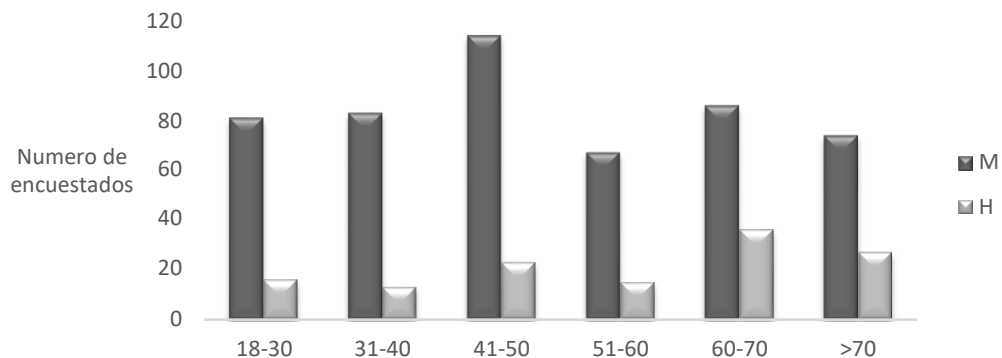


Figura 25. Intervalo de edad de mujeres y hombres entrevistados en el estudio etnobotánico.

Tabla 3. Familias, nombres científicos, comunes, parte utilizada y formas biológicas de plantas medicinales utilizadas en la Sierra Negra de Puebla, México.

Familia	Especie	Nombre común	Parte vegetal	Forma de vida	Frecuencia de Uso	Valor de Uso
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i> L	Manzanilla	HJ,FL	Herbácea	11,65	1,00
Lamiaceae	<i>Mentha x piperita</i>	Hierba buena	HJ	Herbácea	10,71	0,92
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i>	Ruda	HJ	Herbácea	8,98	0,77
Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i> L	Hierba maestra	HJ	Herbácea	8,82	0,76
Amaranthaceae	<i>Dysphania ambrosioides</i>	Epazote	HJ	Herbácea	5,35	0,46
Asteraceae	<i>Haplopappus venetus</i>	Escobilla	HJ, T	Herbácea	5,20	0,45
Xanthorrhoeaceae	<i>Aloe barbadensis</i>	Sábila	HJ	Herbácea	5,20	0,45
Asteraceae	<i>Artemisia</i> sp.	Estafiate	HJ	Herbácea	4,88	0,42
N.I		Tapón	HJ	Herbácea	4,88	0,42
Asteraceae	<i>Arnica montana</i> L	Árnica	HJ	Árbol	3,31	0,28
N.I		Totonikxiuitl	HJ,FR	Herbácea	4,57	0,39
Primulaceae	<i>Primula vulgaris</i>	San pablito	HJ	Herbácea	3,15	0,27
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	HJ	Herbácea	2,68	0,23
Betulaceae	<i>Alnus acuminata</i>	Elite	HJ	Arbusto	1,73	0,15
Lauraceae	<i>Cinnamomum verum</i>	Canela		Arbusto	1,73	0,15
Pinaceae	<i>Pinus ayacahuite</i>	Acahuite	HJ,C	Herbácea	1,73	0,15
Lamiaceae	<i>Salvia microphylla</i>	Mirto	HJ	Herbácea	1,42	0,12
Rubiaceae	<i>Hamelia patens</i> Jacq	Hierba Cimarron	HJ	Herbácea	1,26	0,11
Apiaceae	<i>Apium graveolens</i>	Apio		Arbusto	1,10	0,09
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Hojas de guayaba	HJ	Árbol	0,94	0,08
Rosaceae	<i>Prunus pérsica</i>	Durazno	HJ, C,FR	Árbol	0,94	0,08
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	HJ	Herbácea	0,79	0,07
Tiliaceae	<i>Tilia europea</i>	Flor de tila	HJ	Herbácea	0,79	0,07
Adoxaceae	<i>Sambucus canadensis</i>	Sauco	HJ	Herbácea	0,63	0,05
Asteraceae	<i>Tagetes erecta</i>	Cempazuchitl	HJ,FL	Arbusto	0,63	0,05
Pinaceae	<i>Cedrus</i> sp	Cedro	HJ,C	Arbusto	0,63	0,05
Rutaceae	<i>Citrus X sinensis</i>	Hojas de naranjo	HJ,FR	Arbusto	0,63	0,05
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	HJ	Árbol	0,63	0,05
Amaryllidaceae	<i>Allium sativum</i>	Ajo	Bulbo	Árbol	0,47	0,04
Asparagaceae	<i>Yucca</i> sp	Izote		Arbusto	0,47	0,04
Asteraceae	<i>Tanacetum parthenium</i>	Santa María	HJ	Arbusto	0,47	0,04
Cactaceae	<i>Opuntia</i> sp	Nopal		Árbol	0,47	0,04
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla	HJ,FR	Herbácea	0,47	0,04

Rutaceae	<i>Citrus x limón</i>	Limón	FR	Herbácea	0,47	0,04
Asteraceae	<i>Senecio salignus</i>	Azomiate	HJ	Herbácea	0,31	0,03
Asteraceae	<i>Bidens alba</i>	Amomotzo	HJ	Herbácea	0,31	0,03
Fabaceae	<i>Erythrina americana</i>	Equimite	HJ	Árbol	0,31	0,03
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	Eucalipto	HJ	Herbácea	0,31	0,03
Rutaceae	<i>Citrus x aurantiifolia</i>	Flor de lima	HJ,FL	Herbácea	0,31	0,03
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jitomate		Arbusto	0,31	0,03
Apiaceae	<i>Cuminum cyminum</i>	Comino		Herbácea	0,16	0,01
Asparagaceae	<i>Sansevieria trifasciata</i>	Lengua de vaca	HJ	Herbácea	0,16	0,01
N.I		Ospaxul	HJ	Árbol	0,16	0,01
Rosaceae	<i>Prunus salicifolia</i>	Hoja de capulin	HJ,FR	Árbol	0,16	0,01

Partes vegetales: HJ: hojas, FL; flor, FR: fruto, C; corteza. T: tallo.

*N.I: especie no identificada.

Tabla 4. Resultados de la frecuencia de uso de plantas medicinales por enfermedades en la Sierra Negra de Puebla.

Aparatos o sistemas	Enfermedades	Especies utilizadas	No. de especies utilizadas por enfermedad
Digestivo	Bilis	Hierba maestra (<i>Artemisia absinthium</i>)	1
	Gastritis	Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)	3
Hojas de guayaba (<i>Psidium guajava</i>)			
Hierba maestra (<i>Artemisia absinthium</i>)			
Hígado		Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	1
Infección/Dolor estomacal		Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>)	9
		Hierba santa cimarron (<i>Hamelia patens</i>)	
		Flor de Tila (<i>Tilia europea</i>)	
		Cempazuchitl (<i>Tagetes erecta</i>)	
		Escobilla (<i>Haplopappus venetus</i>)	
		Santa Maria (<i>Tanacetum parthenium</i>)	
		Epazote (<i>Dysphania ambrosioides</i>)	
		Hierba buena (<i>Mentha x piperita</i>)	
		Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)	
	Empacho	Hierba buena (<i>Mentha x piperita</i>)	5
Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)			
Oregano (<i>Origanum vulgare</i> L)			
Mirto (<i>Salvia microphylla</i>)			
Desparasitante	Lengua de vaca (<i>Sansevieria trifasciata</i>)		
	Elite (<i>Alnus acuminata</i>)	6	

		Hojas de naranjo (<i>Citrus X sinensis</i>)	
		Hierba maestra (<i>Artemisia absinthum</i>)	
		Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	
		Durazno (<i>Prunus pérsica</i>)	
		Epazote (<i>Dysphania ambrosioides</i>)	
Circulatorio	Hemorragias	Escobilla (<i>Haplopappus venetus</i>)	1
Excretor	Riñón	Arnica (<i>Arnica montana</i>)	1
Respiratorio	Tos-gripa	Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>)	5
		Oregano (<i>Origanum vulgare</i> L)	
		Hierba buena (<i>Mentha x piperita</i>)	
		Cempazuchitl (<i>Tagetes erecta</i>)	
		Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)	
Endocrino	Diabetes	Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)	1
Nervioso	Nervios	Flor de Tila (<i>Tilia europea</i>)	1
Otros	Irritaciones de la piel	Estafiate (<i>Artemisia ludoviciana</i>)	4
		Santa Maria (<i>Tanacetum parthenium</i>)	
		Mirto (<i>Salvia microphylla</i>)	
		Sauco (<i>Sambucus mexicana</i>)	
	Golpes	Cedro (<i>Cedrus sp</i>)	1
	Quemaduras	Sauco (<i>Sambucus mexicana</i>)	2
		Sabila (<i>Aloe barbadensis</i>)	
	Mal aire-limpias	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	6
		Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	
		Azomiate (<i>Senecio salignus</i>)	
		San pablito (<i>Primula vulgaris</i>)	
		Santa Maria (<i>Tanacetum parthenium</i>)	
		Apio (<i>Apium graveolens</i>)	
	Susto	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	1
	Desinflamatorio/Dolor	Cedro (<i>Cedrus sp.</i>)	10
		Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	
		Elite (<i>Alnus acuminata</i>)	
		Comino (<i>Cuminum cyminum</i>)	
		Equmite (<i>Erythrina americana</i>)	
		Acahuite (<i>Pinus ayacahuite</i>)	
		Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	
		Azomiate (<i>Senecio salignus</i>)	
		Apio (<i>Apium graveolens</i>)	
		Sauco (<i>Sambucus mexicana</i>)	
	Baños postparto	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	2
		Mirto (<i>Salvia microphylla</i>)	
	Cólicos	Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)	3
		Escobilla (<i>Haplopappus venetus</i>)	
		Hierba santa cimarron (<i>Hamelia patens</i>)	

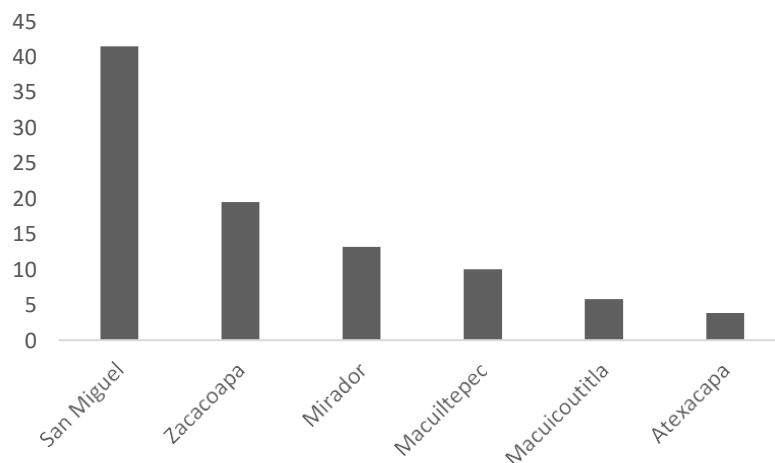


Figura 26. Las comunidades que mostraron mayor conocimiento basándonos en la frecuencia del uso de plantas.

En estudios etnobotánicos relacionados con el uso de plantas medicinales, las percepciones de las personas sobre el uso de la medicina tradicional y la diversidad de plantas que utilizan es amplia, sin embargo, de acuerdo con Arango (2004) y Arias-Toledo et al. (2007) el conocimiento no es homogéneo y hay una gran variedad en el conocimiento del variedad y número de especies de acuerdo a cada población, principalmente por la percepción que cada individuo tenga de su cultura y del ambiente en que se desarrolla. Incluso entre géneros, es notorio que el mayor conocimiento lo poseen las mujeres y las personas de mayor edad (Hanazaki et al., 2000; Vázquez et al., 2011) esto concuerda con lo encontrado en este estudio, en el cual la mujer como ama de casa y encargada del hogar juega un papel muy importante dentro de las familias mexicanas, ya que, además de sus labores domésticas, se encarga de aliviar las enfermedades de sus familiares (Arango, 2004). Los resultados encontrados en este estudio muestran que el mayor conocimiento lo poseen las personas adultas. De acuerdo con Arias-Toledo (2009), la edad también juega un papel importante en el conocimiento de los recursos

naturales, asociándola al menor conocimiento por parte de los jóvenes. Los cambios en las condiciones de vida, el contexto histórico y económico de los jóvenes pone en riesgo que estos saberes se pierdan por desinterés de las nuevas generaciones. La pérdida de conocimiento entre generaciones es de gran preocupación si se considera que muchas poblaciones rurales hacen uso de las plantas medicinales para subsistir (Ladio y Lozada, 2008) de hecho, en este estudio se encontró que un alto porcentaje de la población (85%) no asiste al médico, resuelven sus padecimientos con recetas de plantas medicinales, y sólo van al médico cuando la afectación es muy grave, o no la pueden controlar.

En este estudio se reportó el uso de 43 especies divididas en 9 familias, entre las que sobresalen Asteraceae y Lamiaceae, lo cual coincide parcialmente con los resultados reportados por Gómez-Álvarez (2012), y Magaña et al. (2010) quienes también reportaron un mayor uso medicinal dentro de la familia Asteraceae y Lamiaceae. La familia Asteraceae ocupa un lugar preponderante en la flora de México tanto a nivel de género como de especie y contribuye a la enorme riqueza del país (Villaseñor, 2004; Gómez-Álvarez, 2012).

Del total de especies reportadas (43) son especies de uso medicinal tradicional y su uso ha sido validado con estudios científicos tal es el caso del cempazuchil (*Tagetes erecta*) árnica (*Heterotheca inuloides*) manzanilla (*Matricaria recutita*) mirto (*Salvia microphylla*) entre otras (López et al., 2001; Hernández et al., 2006; Mathur et al., 2011; Nogueira et al., 2008; Vikas et al., 2010; Rodríguez et al., 2015). Los valores encontrados en cuanto al valor de uso (VUis) y frecuencia de uso indican la importancia que algunas especies de plantas representan en las personas.

4.2 FASE II

4.2.1 PRUEBAS FITOQUÍMICAS

En esta fase de estudio al evaluar el rendimiento de los extractos vegetales para *Ricinus communis* fue de 7.23%, de *Salvia microphylla* 6.42%, *Bidens alba* 7.18% y *Sambucus canadensis* 6.11% (tabla 5). Respecto a las pruebas fitoquímicas los

extractos presentaron la mayoría de los componentes evaluados principalmente alcaloides, *Ricinus communis*, *Bidens alba* y *Salvia microphylla* mostraron alta presencia de saponinas, *Sambucus canadensis* además de estos compuestos también mostró alta presencia de flavonoides (Tabla 6).

Tabla 5. Rendimiento de extractos vegetales y comparación de estudios sobre el rendimiento de las especies vegetales evaluadas en este estudio.

Planta	Rendimiento (%)	Comparación	Referencia
<i>Ricinus communis</i>	500 grs= 7.23%	500 grs= 18.45% a 500 grs : 7.84%	Escoto-García, 2016 Parra-Henao, 2007
<i>Salvia microphylla</i>	250 grs= 4.42%	100 grs= 4.23% 75 grs= 7.70±0.80%	Guzmán-Gómez, 2014
<i>Sambucus canadensis</i>	500 grs = 4.11%	12.7% 12.08%	Ortiz, 2013 Maldonado, 2016.
<i>Bidens alba</i>	500 grs=3.18%	100grs= 10%	Vega, 2013

Tabla 6. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios de los cuatro extractos etanolicos.

Extracto vegetal	Alcaloides			Flavonoides			Saponinas		Cumarinas	Triterpenos y/o Esteroles	Glucosidos cianogenicos	Taninos
	M	D	W	A	S	E	R	B	LB	G	G	
<i>Ricinus communis</i>	++	+++	++	++	+	++	+++	++	++	-	++	
<i>Bidens alba</i>	++	++	++	+	++	+	+++	-	-	-	+++	
<i>Salvia microphylla</i>	++	++	++	-	+	+	++	++	++	-	++	
<i>Sambucus mexicana</i>	++	++	+++	++	-	+++	++	++	-	-	++	

*Alcaloides: M = Prueba de Mayer, D = prueba de Drangendorff y W = prueba de Wagner. Flavonoides: A = Prueba del H2SO4, F = FeCL2, S = prueba de Shinoda.

Saponinas: E = Prueba de la espuma, R= prueba de Rosenthaler. Cumarinas: B = Prueba de Baljet. Triterpenos y/o Esteroles: LB = Prueba de Lieberman-Bouchard. Taninos= Gelatina-SAL= G. Glucosidos cianogenicos: G= Prueba de Grignard

Intensidad: mayor +++, mediana++, baja +, nula -

4.2.2 PRUEBAS CROMATOGRÁFICAS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Las pruebas cromatográficas realizadas nos permitieron separar adecuadamente los metabolitos el sistema con mejor resolución fue con el eluyente hexano-acetato de etilo (AcOEt) (5:1) posteriormente con la cromatografía TLC y observación de sus metabolitos con luz UV de onda larga y corta de 254 y 365 nm se observaron los compuestos, en la figura 27 y 28 se pueden observar las bandas cromatográficas encontradas en uno de los extractos vegetales, el procedimiento se realizó para cada extracto vegetal.

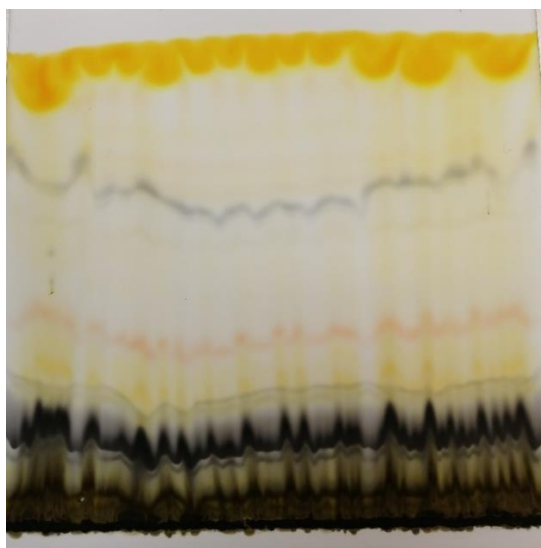


Figura 27. Cromatografía TLC metabolitos del extracto vegetal *Sambucus canadensis*.

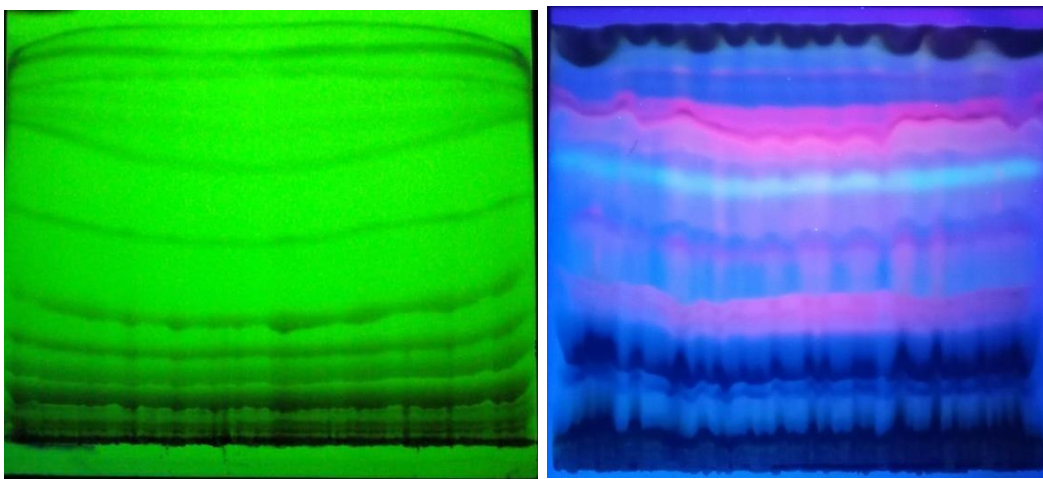


Figura 28. Revelado de las placas bajo luz UV Lamp, P/N 95-0279-0, a las longitudes de onda de 254 y 365 nm.

En este experimento se identificaron los grupos funcionales de los componentes activos en la muestra de extractos de las plantas basándose en el valor máximo en la región de radiación infrarroja utilizando la técnica de espectro FTIR. Los extractos dieron los siguientes picos de absorción característicos el extracto de *Ricinus communis* mostró una señal de estiramiento del enlace C-H en 2853-2924 cm^{-1} y una señal en 1733-1637 cm^{-1} características del grupo carbonilo C=O también se observó señales C-O en 1034 cm^{-1} presentes en los alcaloides. El espectro de *Bidens alba* mostró una señal ancha de tensión en 3343.26 cm^{-1} correspondiente al grupo O-H, y una señal de estiramiento C-H en 2923.28 cm^{-1} señales del grupo carbonilo C=O en 1614.06 cm^{-1} así como una señal intensa C-O en 1036 cm^{-1} presentes en los alcaloides. El espectro de *Salvia microphylla* evidenció una señal de estiramiento en 3273-2870 cm^{-1} correspondiente al O-H, y una señal intensa en C=O en 1602-1702 cm^{-1} y señales C-C en 1043-1173-1326 cm^{-1} característico del grupo carbonilo. La absorción para el grupo de cetonas da origen a múltiples bandas en el espectro de IR. Las cetonas alifáticas absorben en el intervalo de 1230 cm^{-1} - 1100 cm^{-1} en nuestras muestras la señal a 1326 cm^{-1} y 1173 cm^{-1} se identificaron como modos vibracionales de extensión y flexión correspondientes al grupo de

cetonas que presentan picos débiles y estrechos (Domínguez-Pérez et al., 2019; Ng et al., 2014). El espectro de *Sambucus canadensis* mostró una señal de tensión de O-H en 3359.01 y una señal de estiramiento C-H en 2924.69 cm^{-1} una señal de torsión del enlace C-H en 1401.71 cm^{-1} correspondiente a los flavonoides. En la figura 28, se muestran los 4 espectros de infrarrojo y se muestran las señales destacadas, absorciones características para grupos O-H entre 3273.34 hasta 3350.01 cm^{-1} lo cual sugiere la posible formación de puentes de hidrógeno intermoleculares por la señal ancha. Una señal de estiramiento del enlace C-H en un rango de 2853.52 hasta 2955 cm^{-1} Indica la presencia de dobles enlaces C=C de 1400 a 1600 cm^{-1} Las otras bandas identificadas son las características para grupos carbonilo, las cuales se observan en la región de 1600 y 1734 cm^{-1} . Los espectros de cada extracto vegetal se pueden ver en el anexo 4.

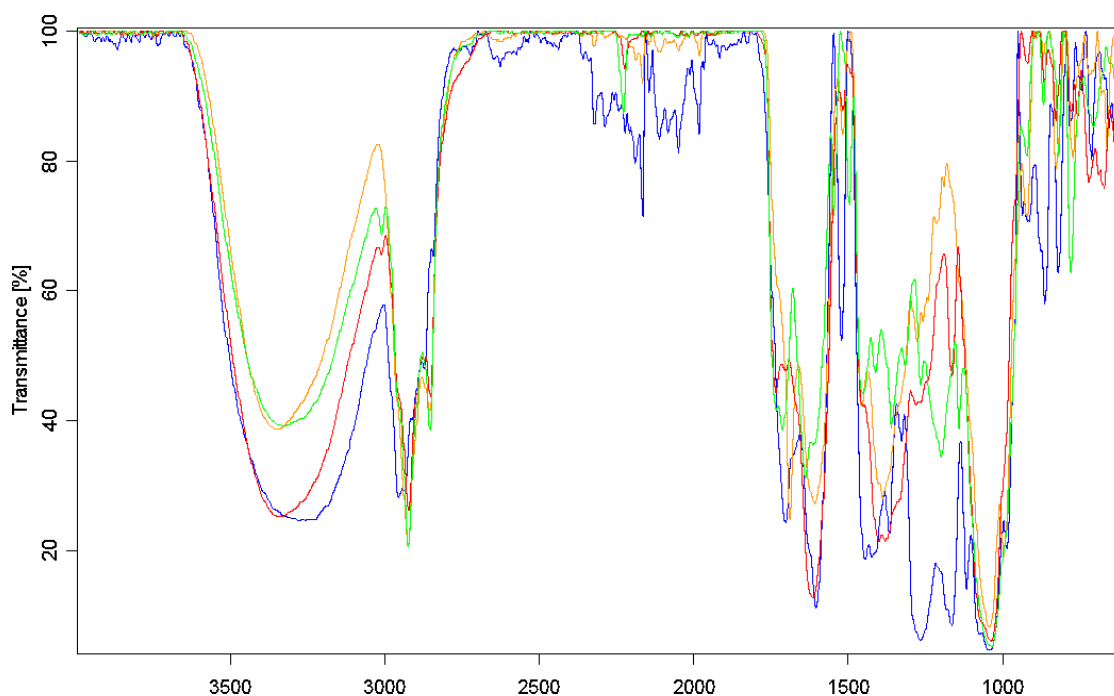


Figura 29. Espectro de infrarrojo de 4000 to 600 cm^{-1} de las especies: *Sambucus canadensis*: línea amarilla, *Ricinus communis*: línea verde, *Bidens alba*: línea roja, *Salvia microphylla*: línea azul.

4.3.3 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS IN VITRO E IN VIVO

Todos los extractos vegetales mostraron actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco se utilizó (BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, 2007) para clasificar los valores de inhibición como resistente (7mm) intermedio (8-9mm) y sensible (<10 mm). Los resultados de los diámetros de las zonas de inhibición se muestran en la Tabla 3. Se puede observar que los extractos de *Sambucus canadensis* presento una fuerte actividad (sensible) contra *S. aureus* con diámetro de inhibición de 12 mm, una actividad resistente contra *V. chlorae* (7,7 mm) (figura 27). El extracto de *Ricinus communis* mostro un nivel intermedio contra *S. aureus* en las demás cepas mostró actividad intermedia. El extracto de *Salvia microphylla* y *Bidens alba* mostró actividad frente a *S. aureus* y *K. pneumonie* (figura 30, 31) Por otro lado, las cepas que mostraron mayor resistencia y menores halos de inhibición fueron *S. typhimarium* y *V. chlorae*.

Tabla 7. Actividad bacteriana de los extractos vegetales y los halos de inhibición

Extractos vegetales	Diámetro zona de inhibición (mm) ± Desv. Estandár					
	<i>K. Pneumonie</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>V. chlorae</i>	<i>S. typhimurim</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Sambucus canadensis</i>	10,7 ± 0,6 ^I	9,3 ± 0,5 ^I	12,7 ± 1,5 ^S	7,7 ± 0,6 ^R	9,7 ± 1,5 ^I	9,3 ± 0,6 ^I
<i>Ricinus communis</i>	9,3 ± 1,0 ^I	8,1 ± 1,0 ^R	9,0 ± 1,0 ^I	7,3 ± 0,6 ^R	8,3 ± 0,6 ^R	8,0 ± 1,0 ^R
<i>Salvia microphylla</i>	10,3 ± 0,6 ^I	8,7 ± 0,6 ^R	12,3 ± 0,6 ^S	7,5 ± 0,5 ^R	8,0 ± 0,0 ^R	9,3 ± 0,6 ^R
<i>Bidens alba</i>	10,3 ± 0,6 ^I	9,0 ± 1,0 ^I	10,3 ± 0,6 ^I	7,3 ± 0,6 ^R	7,7 ± 0,6 ^R	9,3 ± 0,6 ^I
DMSO	7,0 ± 1,0 ^R	6,3 ± 0,6 ^R	6,3 ± 1,0 ^R	-	-	-
<i>Gentamicina</i>	12,6 ± 0,57 ^I	10,6 ± 1,5 ^I	14,3 ± 0,5 ^S	9,6 ± 0,57 ^I	11,3 ± 1,1 ^S	10,6 ± 0,5 ^S

*Resistant (R)
Intermediate (I)
Susceptible (S)

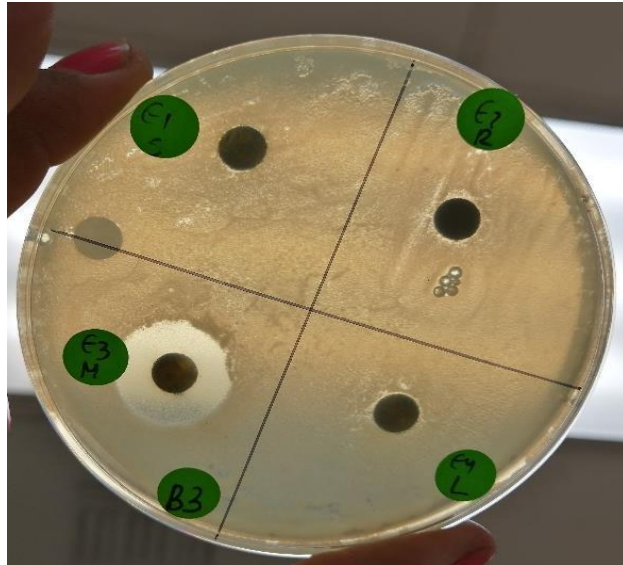


Figura 30. Halo de inhibición del extracto vegetal de *Salvia microphylla* frente a *S. aureus*.



Figura 31. Halo de inhibición del extracto vegetal de *Sambucus canadensis*

4.3.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

La efectividad de los extractos en las cepas bacterianas probadas se determinó midiendo la concentración mínima inhibitoria. Las cepas más susceptibles fueron *S. aureus*, *Kl. pneumoniae*, así como *E. coli* con valores de CMI de 75.8 y 65.1 y 100

µg/mL mientras que *V. chlorae* y *S. typhimurium* fueron las bacterias más resistentes a los extractos con valores mayores a 1000 µg/mL (Tabla 8). Respecto a la Concentración Mínima Bactericida (CMB), la especie *Salvia macrophylla* inhibió el crecimiento de *E. coli*, la especie *Bidens alba* y *Sambucus mexicana* inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, y el extracto de *Ricinus comunis* inhibió el crecimiento de *K. pneumoniae* y *E. coli* (Tabla 9).

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos vegetales contra los organismos de prueba.

Extracto	MIC (µg/mL)					
	<i>Kl. Pneumonie</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. typhimarium</i>	<i>V. chlorae</i>
<i>Sambucus canadensis</i>	68.1	115.18	75.6	> 450	< 1000	< 500
<i>Ricinus comunis</i>	200	200	< 1000	> 300	< 1000	> 250
<i>Salvia microphylla</i>	> 200	> 100	> 400	> 400	> 1000	> 500
<i>Bidens alba</i>	< 1000	> 300	100	100	< 1000	> 1000

Tabla 9. Extractos vegetales con las concentraciones evaluadas y la CMB para cada bacteria *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*.

Extractos vegetales	Concentración	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. chlorae</i>	<i>S. typhimurium</i>
<i>Salvia macrophylla</i>	500	(-)	(-)	(++)	(+)	(+)	(+)
	250	(-)	(-)	(++)	(++)	(++)	(++)
	125	(+)	(-)	(++)	(++)	(++)	(++)

<i>Sambucus mexicana</i>	500	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
	250	(+)	(-)	(++)	(-)	(++)	(++)
	125	(+)	(-)	(++)	(-)	(++)	(++)
<i>Bidens alba</i>	500	(++)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
	250	(++)	(-)	(++)	(-)	(++)	(++)
	125	(++)	(-)	(++)	(-)	(++)	(++)
<i>Ricinus communis</i>	500	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(+)
	250	(-)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)
	125	(-)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)

*Crecimiento (-) Negativo, (+) Poco, (++) Medio (+)(+)(+) Abundante.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los 4 extractos vegetales fue variable para cada extracto y bacteria, sin embargo, los 4 extractos vegetales tuvieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10). El extracto de *Salvia microphylla* tuvo % de inhibición mayores a 60% en 3 de las 4 bacterias evaluadas *K. pneumoniae*, *E. coli* y *S. aureus*. La menos concentración a la que tuvo inhibición fue de 125 µg/mL contra la bacteria *E coli*, la bacteria contra la que se alcanzó un mayor % de inhibición fue *K. pneumoniae*. El extracto de *Ricinus communis* presentó % de inhibición mayores a 60% para todas las bacterias incluso alcanzo % de inhibición de 98% con la menor concentración frente a *K. pneumoniae*. El extracto de *Bidens alba* presentó % de inhibición mayores al 60% únicamente contra la bacteria de *E. coli* y *S. aureus*, siendo más efectivo contra *S. aureus* alcanzando

hasta 95% de inhibición. El extracto de la especie *Sambucus canadensis* presento valores de inhibición de más de 60% para 3 de las 4 bacterias evaluadas.

Tabla 10. Extracto vegetal, bacterias, concentración, media % de inhibición, Concentración Mínima Inhibitoria y valor de p > 0.005.

Extracto	Bacteria	Concentracion mg/MI	Media	% inhibición	CMI	p	
<i>Salvia microphylla</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Control	1,063 a		250	0,0001	
		125	0,4043 a	62			
		250	0,3923 b	63,1			
	<i>Escherichia coli</i>	Control	1,384 a			125	0,0001
		125	0,417 b	69,5			
		250	0,459 b	66,8			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Control	1,509 a			500	0,006
		125	1,395 a	7,5			
		250	1,419 a	5,9			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Control	1,496 a			500	0,001
		125	1,375 b	8			
		250	1,376 b	8			
	<i>Ricinus communis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Control	1,086 a		125	0,0001
			125	0,017 b	98,4		
			250	0,028 b	97,4		
<i>Escherichia coli</i>		Control	1,521 a			125	0,0001
		125	0,220 b	85,4			
		250	0,226 b	85,4			
<i>Staphylococcus aureus</i>		Control	1,513 a			500	0,018
		125	1,448 a	7,5			
		250	1,436 b	5,9			
<i>Enterococcus faecalis</i>		Control	1,459 a			500	0,001
		125	1,282 b	11,7			
		250	1,328 b	8,9			
<i>Bidens alba</i>		Control	1,187 a			250	0,0001
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125	1,178 a	10,54		

	250	1,063 b	11,27		
	500	1,033 b	12,38		
	Control	0,9147 a			
<i>Escherichia coli</i>	125	0,782 a	72,2	250	0,0001
	250	0,42 b	64,4		
	500	0,332 b	62,8		
	Control	0,988 a			
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	0,205 b	95,02	125	0,0001
	250	0,099 b	94,19		
	500	0,055 c	80,02		
	Control	1,496 a			
<i>Enterococcus faecalis</i>	125	1,411 b	7,34	500	0,001
	250	1,426 b	33,6		
	500	1,441 b	47,5		
<hr/>					
<i>Sambucus canadensis</i>	Control	1,076 a		500	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125	0,982 a	8,7		0,001
	250	0,973 a	9,4		
	500	0,052 b	95,16		
	Control	1,6267 a			
<i>Escherichia. coli</i>	125	0,451 b	72,2	125	0,0001
	250	0,578 b	64,4		
	500	0,603 b	62,8		
	Control	1,567 a			
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	0,078 b	95,02	125	0,0001
	250	0,091 c	94,19		
	500	0,313 c	80,02		
	Control	1,489 a			
<i>Enterococcus faecalis</i>	125	1,38 a	7,34	250	0,001
	250	0,988 b	33,6		
	500	0,781 c	47,5		

4.4 SENSIBILIDAD BACTERIANA DE METABOLITOS DEL EXTRACTO VEGETAL *SAMBUCUS CANADENSIS*

Respecto a la sensibilidad bacteriana de los metabolitos de la especie con mayor actividad antimicrobiana, en la tabla 11 se pueden ver los halos de inhibición reportados para 8 metabolitos encontrados al realizar las pruebas cromatográficas. El metabolito con mayor actividad antimicrobiana fue el metabolito 5 y 6 los cuales fueron probados contra las cepas de interés en este estudio encontrando importantes halos de inhibición los cuales pueden verse en la tabla 12.

Tabla 11. Diámetro de halos de inhibición de los metabolitos evaluados del extracto vegetal *Sambucus canadensis*.

Microorganismo	Diámetro de los halos de inhibición (mm)								
Metabolito	C	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>V. chlorae</i>	-	-	-	-	8	7	7	8	-
<i>S. typhimurium</i>	8	9.5	8.5	-	9.2	8	7	-	-
<i>K. pneumonie</i>	9	9.0	10	8	7.5	8	9	-	6
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	7	6	8	6
<i>S. aureus</i>	9	7	6	6	-	8	9	9	7
<i>E. faecalis</i>	6	-	-	-	-	9	8	8	6

Tabla 12. Diámetro de halos de inhibición de los metabolitos con mayor actividad antimicrobiana.

Metabolitos	1	2	3	5	6
<i>K. pneumonie</i>	8	8	8	10	8
<i>E. coli</i>	8	7	-	8	6
<i>S. aureus</i>	8	7	7	9	7
<i>V. chlorae</i>	-	8	7	8	9
<i>S. typhimurium</i>	-	9	7	8	9
<i>E. faecalis</i>	8	9	-	7	-

4.5 PRUEBAS *IN VIVO*

Respecto a los resultados obtenidos de las pruebas *in vivo* los 4 extractos de plantas disminuyeron la carga bacteriana de acuerdo con los límites máximos permisibles en la Norma Mexicana, para la bacteria de *S. aureus*, el extracto de *Sambucus canadensis* y *Ricinus comunis* fueron los más efectivos, para *E. faecalis*; *Salvia microphylla* y *Ricinis communis*, para *E. coli* y *K. pneumonie* *Bidens alba*, *Sambucus canadensis* y *Salvia microphylla* fueron los más efectivos. Los resultados se pueden observar en la figura 32.

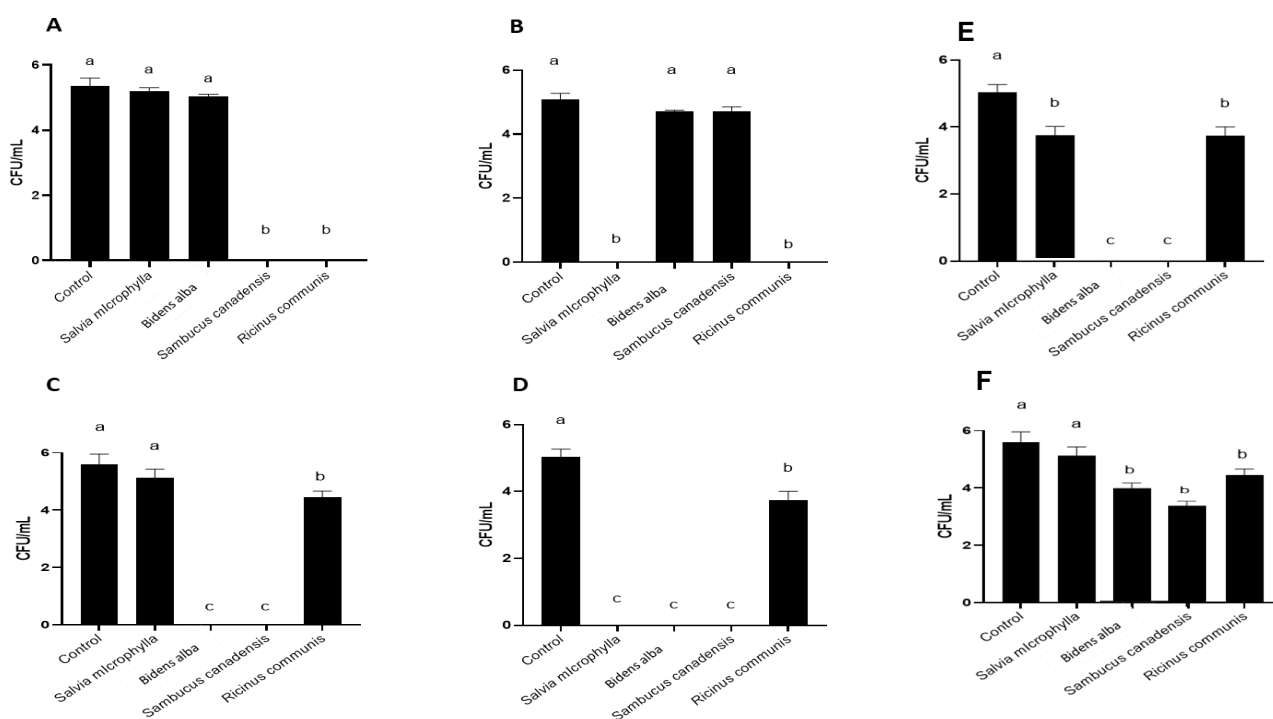


Figura 32. Pruebas antimicrobianas en postcosecha utilizando *Solanum lycopersicum* A) *S. aureus*, B) *E. faecalis* C) *E. coli* D) *K. pneumonie* e) *Vibrio chlorae* f) *Salmonella typhimurium* Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

Actualmente los productos naturales han captado gran interés debido a que ofrecen mayor seguridad al derivarse de fuentes naturales (Adnan et al. 2017, Quinto et al. 2020). Las plantas utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas por su uso en medicina tradicional en comunidades indígenas para el tratamiento de diversas

enfermedades. Los extractos vegetales de estas plantas mostraron contener compuestos como; alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides. Estas moléculas les confieren distintas actividades antimicrobianas, los taninos son capaces de inhibir las enzimas microbianas extracelulares (Clapé and Castillo, 2011; Martinez-Frances et al., 2017, Patil, and Bhise, 2015). De acuerdo con Díaz et al., (2009) las saponinas forman complejos con esteroides de las membranas celulares, produciendo grandes poros en las mismas y alterando su permeabilidad, por lo que la célula se lisa, ocasionando la ruptura de las membranas bacterianas; es por ello que, las saponinas aisladas de hojas, frutos, semillas, tallos, se utilizan en jabones y productos antimicrobianos (Khan et al., 2009, Yadava et al., 2008). Otros componentes asociados a la actividad antimicrobiana son los alcaloides, su principal función es la protección de las plantas contra microorganismos presentes en el ambiente (Rodríguez-Sauceda, 2011). Los alcaloides tienen efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos por su capacidad de dañar el DNA microbiano, y detener la síntesis de proteínas, e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos con esto se induce la apoptosis celular (Sepulveda et al., 2003; Suffredini et al., 2002). Los flavonoides poseen actividad antifúngica, antiviral y antibacteriana, algunos flavonoides aislados como la quercetina y rutina, inhiben la síntesis de ADN y ARN, y generan daños en la membrana de las células bacterianas (Cushnie et al. 2005, Wang et al. 2013, Hossion et al., 2011, Hirai et al., 2010). De acuerdo con Debib et al. (2017) Ng et al., (2014) Baris et al., (2006), Cutter (2000) la presencia de estos compuestos en los extractos evaluados podría explicar la actividad antimicrobiana encontrada en este estudio. Asimismo, se ha indicado que la sinergia de los compuestos que presentan los extractos crudos producen mejores efectos que los componentes individuales (Mehmood et al. 2018).

Respecto a las pruebas cromatográficas el gel de sílice o ácido silícico es uno de los más utilizados, es débilmente ácido, su pH oscila entre 4-5 con lo cual no se deberá utilizar con sustancias que se corrompan con los ácidos. Se emplea placa de sílica GF254 que representa al factor de fluorescencia; el cual revelará mediante luz UV las manchas de las sustancias que absorben luz ultravioleta, el número que

aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado y el grosor del gránulo de la placa. Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato de cálcico semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente. También han sido incorporados dos indicadores del ultravioleta (Bruneton 2003). En este sentido la polaridad de las moléculas que representa la separación de las cargas eléctricas en la misma. Está íntimamente relacionada con otras propiedades como la solubilidad, punto de fusión, punto de ebullición, fuerzas intermoleculares, etc. Al formarse una molécula de modo covalente el par de electrones tiende a desplazarse hacia el átomo que tiene mayor electronegatividad, esto origina una densidad de carga desigual entre los núcleos que forman el enlace (se forma un dipolo eléctrico). El enlace es más polar cuanto mayor sea la diferencia entre las electronegatividades de los átomos que se enlazan. Pero un enlace polar no requiere siempre una molécula polar; para averiguar si una molécula es polar hay que atender a la cantidad de enlaces polares y la estructura de la molécula. Para ello es necesario determinar un parámetro físico llamado momento dipolar eléctrico del dipolo eléctrico (Barragán, 2011). La capacidad de asociación puede expresarse en términos de la constante dieléctrica. Cuanto más polar sea un solvente mayor será su respectiva constante dieléctrica (Sharapin, 2000, p. 35). El método de separación por cromatografía en capa fina (TLC), presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, permitiendo observar a simple vista la separación de los componentes. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos (García, 2007).

La ventaja de TLC es la simplicidad en la cualificación de la separación: los componentes de colores se pueden ver a simple vista y aquellos que absorben luz por debajo de los 400 nm se agrega un tinte fluorescente en la placa. Por otro lado, al iluminar la placa con una lámpara de 256 nm y 366 nm, revelará componentes con fluorescencia nativa. Bajo estas condiciones, todos los metabolitos secundarios se pueden observar normalmente, sin embargo, si los métodos anteriores no son

suficientes, la exposición de la placa a vapores de yodo, enriquece la fase estacionaria y facilita el reconocimiento de estas sustancias. El TLC se caracteriza por ser un método abierto, es decir, su placa es accesible y facilita la aplicación de agentes reveladores, cuya función es detectar y resaltar componentes que no se distinguen muy bien a simple vista por medio de reacciones químicas.

Respecto a la actividad antimicrobiana encontrada en las pruebas de difusión en disco todos los extractos presentaron halos de inhibición ≤ 8 mm frente a las bacterias evaluadas a excepción de *V. chlorae* y *S. typhimarium*. Las hojas del extracto etanólico de *Sambucus canadensis* presentó los mayores halos de inhibición, con zonas máxima de inhibición de 12.7 y 10.7 mm frente a *S. aureus* y *K. pneumoniae*. Al comparar los resultados encontrados en este estudio con los de la literatura, Rodino et al. (2015) evaluó el efecto de *Sambucus nigra* contra *S. aureus* encontrando una sensibilidad mínima de 9 mm, sin embargo, reportó un efecto inhibitorio frente otras cepas como *E. faecalis* y *E. coli*. Benevides et al. (2017) realizó estudios con *Sambucus australis* y obtuvo efectos inhibitorios contra *S. typhimurium* y *K. pneumoniae*.

El extracto de *Ricinus communis* mostró pequeños halos de inhibición frente a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, mostrando poca sensibilidad, estos resultados difieren a lo reportado por Verma et al. (2011) en donde reportan halos de inhibición ≤ 20 mm para algunas de las bacterias reportadas en este estudio. Suurbaar et al. (2017) reportó halos de 20, 21, 01 mm para *E. coli*, *S. aureus*, y *K. pneumoniae* respectivamente. El extracto de *Bidens alba* mostró ser más sensible frente *S. aureus* y *K. pneumoniae*. Estos resultados coinciden con los reportados para otras subespecies Chavasco et al. (2014) reportó que *Bidens pilosa* tuvo un efecto antimicrobiano con halos de inhibición de 22, 14, 12 mm frente *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. coli* respectivamente. Asimismo, de acuerdo con Deba et al. (2008) y Chiavadari et al. (2020) el extracto de *Bidens alba* ejerce importantes actividades antibacterianas y antifúngicas. Por otro lado, *Salvia microphylla* mostró mayor inhibición frente *S. aureus* (12.1 mm) y frente *K. pneumoniae* (9 mm) lo cual coincide con lo reportado por otros autores que indican que las especies de *Salvia* exhiben

importante actividad bacteriana frente a cepas como *E. coli* (Abdelkader et al. 2014). Se ha indicado que la actividad antimicrobiana de las plantas de *Salvia spp.* tienen el potencial de influir en la prevalencia de microorganismos transmitidos por los alimentos tanto susceptibles como resistentes. Por lo tanto, los extractos y aceites esenciales derivados de esta especie podrían utilizarse como alternativas de los conservantes sintéticos (Sharifi-Rad et al. 2018).

Respecto a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los microorganismos patógenos usados en este estudio. El extracto de *Sambucus canadensis* mostró un efecto inhibitorio frente *K. pneumoniae* (CMI= 68.1 µg/mL) y *S. aureus* (CMI= 75.6 µg/mL), estos resultados coinciden con lo reportado por Hearst et al. (2010) y Holetz et al. (2002) en la eficacia de *Sambucus canadensis* frente a *S. aureus*. Por otro lado, a diferencia de los resultados encontrados en este estudio con *S. canadensis*, Bahiense et al. (2017) reporta que *Sambucus australis* exhibió actividad antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* (250µg/mL) y *Klebsiella pneumoniae* (250µg/mL). Respecto a *Ricinus communis* tuvo efectos de inhibición mayores a 1000 lo cual difiere de lo reportado por Suurbaar et al. (2017) con valores de 6.25mg/ml, para *E. coli* 3.13mg/ml *S. aureus* 12.50 mg/ml. Asimismo Naggar et al. (2018) reportó que los metabolitos derivados de Ricino mostraron fuerte actividad frente diversas bacterias 3 de las evaluadas en este estudio *S. aureus*, *E. coli*, y *K. pneumoniae*.

En este estudio el extracto de *Bidens alba* fue el más activo después de *Sambucus canadensis*. Falowo et al. (2016) por su parte reportó a *Bidens pilosa* con halos de inhibición de 2.5 mg/ml contra *S. aureus* 1. 25 mg/mL, *E. faecalis* y *E. coli* 10.0 mg/mL.

Respecto al extracto de *Salvia microphylla* la CMI para *S. aureus* encontrados en este estudio fueron más bajos que los reportados por Lima et al. (2011) con 7.81 mg/ml para *S. aureus*. señala que *Salvia microphylla* muestra mejor actividad frente bacterias Gram (+) incluso muestra inactividad frente bacterias Gram (-) como *E. coli* (Fraternale et al. 2012). Asimismo, de acuerdo con Naz et al. (2012) y Weerakkody et al. (2010) las bacterias Gram-positivas son más sensibles a los

extractos de plantas que las bacterias Gram-negativas Aunque en este estudio encontramos inhibición importante de bacterias Gram negativas. Por otro lado, pocos estudios han evaluado la eficacia de los extractos vegetales en pruebas in vivo y algunos solo evalúan su eficacia frente a hongos patógenos (Luna-Guevara et al., 2015; Tian et al., 2011) en este estudio se mostró que los 4 extractos vegetales presentaron resultados en la disminución de la carga de bacterias de acuerdo con los límites máximos permisibles (Figura 2). Incluso se encontraron efectos en bacterias que son indicadores de calidad microbiológica o vida útil de los alimentos como *E. coli* (Acevedo et al., 2001; Kopper et al., 2009).

El uso de productos naturales para reducir la carga bacteriana pudiera ser de interés industrial, para países como México que aún tiene problemas por enfermedades causadas por alimentos contaminados por bacterias de gran importancia como *S. aureus* y *E. coli* (Somchit et al., 2003; Sudhakar et al., 2006). Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Tiwari et al., (2009) Tornuk et al., (2011); Serra et al., (2008) mostrando que las plantas pueden emplearse en la industria alimentaria como antibacterianos por el efecto que muestran frente a bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Del mismo modo, de acuerdo con Cos et al., (2006) y Kim y Fung (2004) los extractos de plantas son fuente importante para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos, debido a la amplia diversidad química que presentan. Por tanto, es importante incentivar la investigación sobre el uso de plantas como una alternativa eficaz para atacar bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos. En especial para un país como México por la gran riqueza vegetal con más de 1340 plantas reportadas con propiedades antimicrobianas (Tajkarimi et al., 2010). Sin embargo, algunas plantas pueden tener efectos tóxicos por las propiedades que contienen (Neira et al., 2018) por ello es importante realizar estudios farmacológicos y toxicológicos, de esta forma tener bases científicas que sustenten la seguridad efectividad y calidad del extracto utilizado.

4.6 FASE III

4.6.1 PRUEBAS GENOTÓXICAS Y CITOTÓXICAS DEL EXTRACTO *SAMBUCUS CANADENSIS*

Las pruebas fitoquímicas del extracto de *Sambucus canadensis* reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos. Las pruebas del espectro de infrarrojo (TFIR) del extracto mostró distintas frecuencias de estiramiento y flexión; las frecuencias de estiramiento del enlace O-H en 3350 cm^{-1} es asociado a grupos fenólicos, al estar involucradas en enlaces por puente de hidrógeno, se produce un ensanchamiento de la banda. Las vibraciones de estiramiento del enlace C-H correspondientes a los grupos metilo y metileno aparecen en un rango $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ y las bandas en la región de la huella dactilar se deben a las vibraciones de flexión en 1386 cm^{-1} para el metilo y 716 cm^{-1} para el etilo, las vibraciones de estiramiento del enlace carbonilo, C=O aparecen en un rango $1750\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la presencia de flavonoides. Asimismo, en un rango $1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ aparece un doble enlace conjugado C=C de los anillos aromáticos característico de la estructura base de los flavonoides (Figura 33).

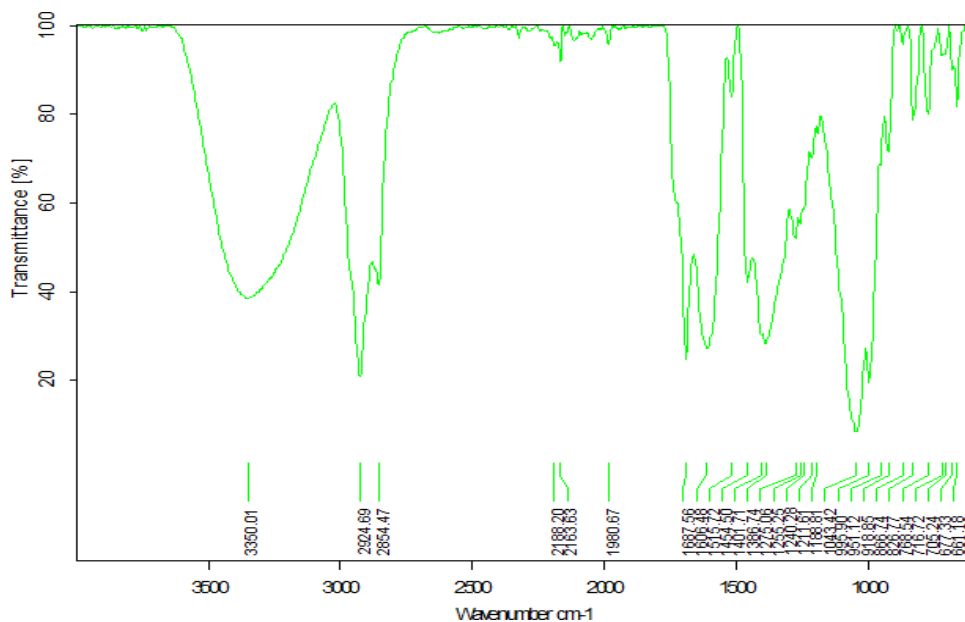


Figura 33. Espectro de infrarrojo (IFTR) del extracto etanólico de *Sambucus canadensis*.

La longitud de raíces y tallo de *Allium sativum* se pueden observar en las figuras 34,35 y 36. Al finalizar la exposición en la concentración de 1000 y 1500 mg/L la longitud fue de 7,66 mm y 0,72 mm respectivamente mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p=0.000$). Considerando los otros tratamientos no hubo diferencias significativas ($p>0.05$). Respecto a la longitud del tallo la concentración de 1500 mg/L (2,36 mm) mostró diferencia estadísticamente significativa respecto a la longitud del tallo del grupo control ($p=0.000$). Se puede observar que la longitud promedio disminuyó dependiendo de la concentración al igual que el número de raíces (Tabla 13). En cuanto a la morfología en la concentración de 125 y 250 mg/L no se observaron diferencias al compararlas con el control, sin embargo, en las concentraciones de 500 y 1000 mg/L las raíces aparecieron amarillas, en 1500mg/L las escasas raíces se tornaron marrones y mostraron rigidez, del mismo modo, se observaron efectos en tallo como torsiones y cambio de color principalmente en las concentraciones de 1000 y 1500mg/L.

Los resultados de número de raíces y la longitud de raíces y tallo, así como el índice mitótico se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), las diferencias se evaluaron con la prueba pos hoc de Dunnet. Las anomalías nucleares se evaluaron con la prueba de Chi cuadrada (X^2) con el programa estadístico Minitab 8.1 las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con valor de $p<0.05$.

Respecto a los resultados obtenidos del índice mitótico, en la Tabla 14 se puede observar una disminución del IM al aumentar la concentración, el número de células en división (profase, metafase, anafase y telofase), difirió entre las concentraciones, no obstante, en 125, 250 y 500 mg/L no fueron significativamente diferentes respecto al control ($p>0.05$). En la concentración de 1500 mg/L se observa una disminución estadísticamente significativa del índice mitótico respecto al control.

Las anomalías nucleares (AN) en *Allium sativum* se muestran en la Tabla 15. Las concentraciones 500, 1000 y 1500 mg/L del extracto etanólico presentaron el mayor número 125 y 250 mg/L una menor cantidad. El número de células en mitosis con anomalías estuvo relacionado con el aumento de la concentración. La Figura 37 muestra anomalías como rotura, pérdida de cromosoma, puentes, cromosomas vagabundos y rezagados entre otros.



Figura 34. Crecimiento de raíces y tallo al iniciar el tratamiento de exposición con el extracto vegetal *Sambucus canadensis*

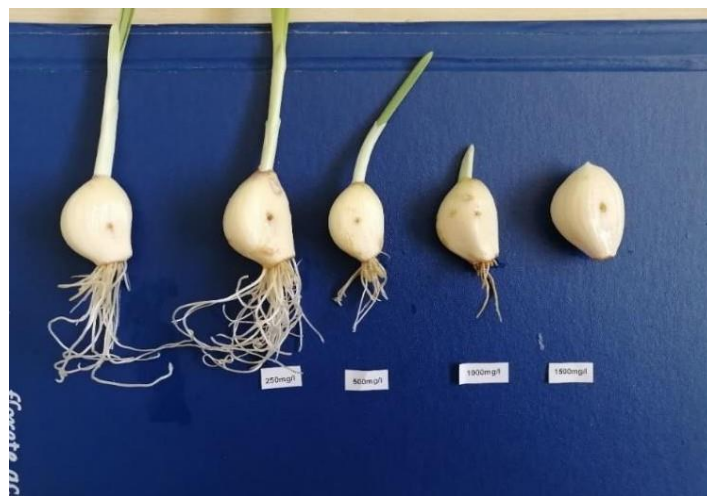


Figura 35. Crecimiento de raíces y tallo en el día 5 del tratamiento de exposición con el extracto vegetal *Sambucus canadensis*



Figura 36. Crecimiento de raíces y tallo al finalizar el tratamiento de exposición con el extracto vegetal *Sambucus canadensis*

Tabla 13. Número y longitud de raíces y tallo de *A. sativum* expuestos al extracto etanólico de *Sambucus canadensis*

Tratamiento mg/L	Numero de raíces (\bar{x}) (δ)	Longitud de raíces (\bar{x}) (δ)	Longitud de tallos (\bar{x}) (δ)
125	13.2 ± 2.66	15.82 ± 724	25.52 ± 17.54
250	9.84 ± 4.94	11.47 ± 6.12	18.76 ± 10.81
500	11.20 ± 6.81	19.76 ± ±12.95	20.8 ± 12.62
1000	7.36 ± 3.68	8.66 ± 10.32*	17.6 ± 8.43
1500	0.92 ± 0.90 *	0.72 ± 0.42 *	2.36 ± 0.46*
Control	13.4 ± 7.96	25.84 ± 19.79	36.3 ± 44.25

*Diferencias estadísticamente significativas

Tabla 14. Numero de células de *A. sativum* en las diferentes fases del ciclo celular, índice mitótico del extracto de *Sambucus canadensis*.

Tratamiento mg/L	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Células en división	índice mitótico (%)
Control	3831	1988	81	59	41	2169	36,1
125	4020	1840	66	39	35	1980	33
250	4356	1571	29	23	21	1644	27,4
500	4306	1580	58	34	32	1704	14,3
1000	4558	1330	36	15	21	1402*	12,0
1500	5398	556	17	13	16	602*	5,03

*Prueba ANOVA diferencias significativas $p < 0.05$

Tabla 15. Anormalidades celulares observadas en *A. sativum* expuesto al extracto etanólico de *Sambucus canadensis*.

	Tratamientos mg/L					
	Control	125	250	500	1000	1500
Numero de células en división	2169	1980	1644	1704	1442	602
Puentes	-	-	1	4	37	25
Fragmento de cromosoma	-	-	2	-	4	5
Célula binucleada	2	3	24	99	40	30
Cromosoma retardado y desorientado	2	1	1	7	7	4
Cromosoma pegajoso	-	1	-	1	5	2

Cromosoma vagabundo	-	-	-	2	3	4
Trinucleada	-	-	-	10	5	20
Total de células aberrantes	4a	5a	28b	123b	101b	90b
Células aberrantes (%)	0,2	0,3	1,7*	7,2*	7,0b	15,0b

* Prueba chi cuadrada. Diferencias significativas $p < 0.05$

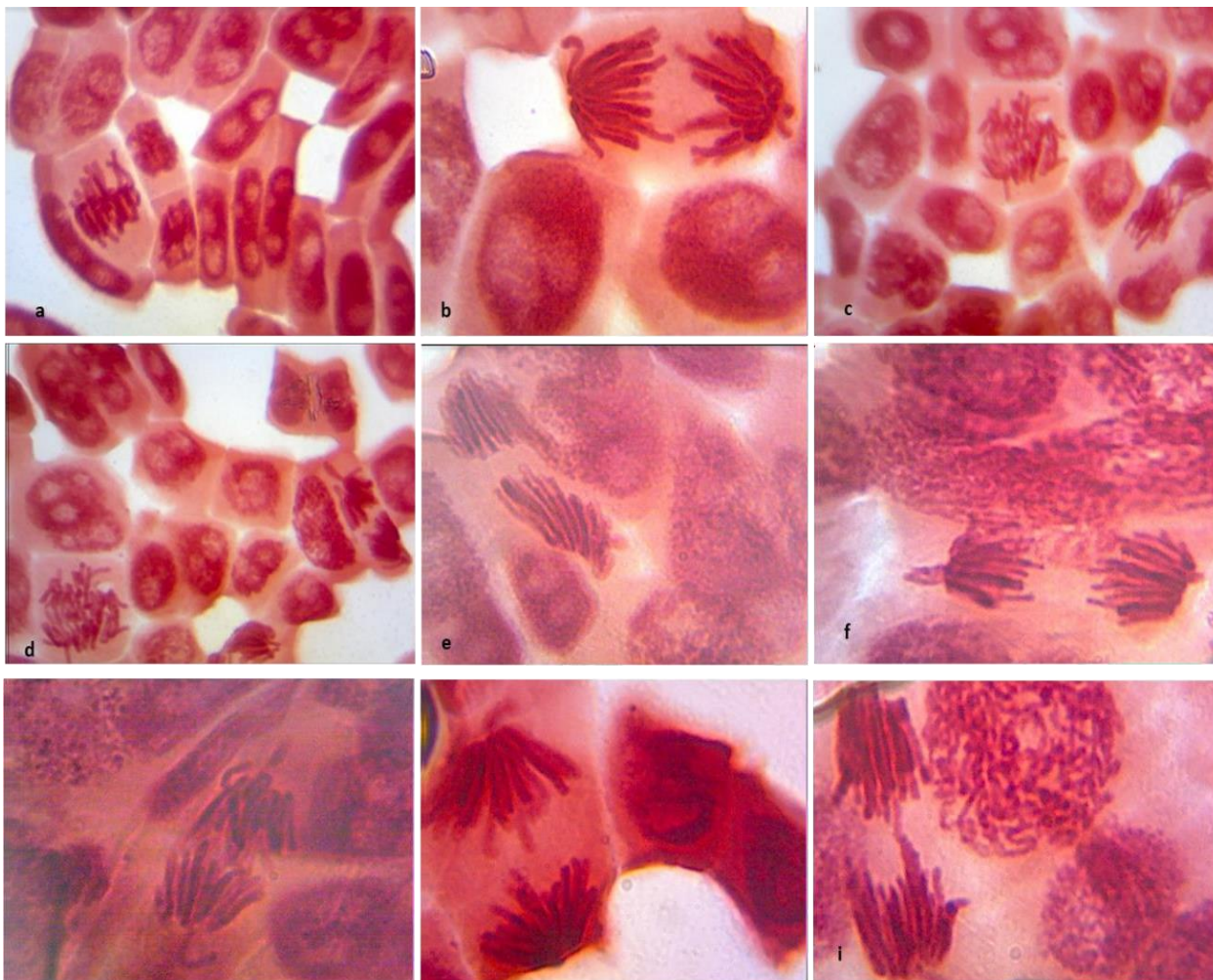


Figura 37. Células de *Allium sativum* expuestas al extracto etanólico de *Sambucus canadensis* a) Cromosoma pegajoso b) puentes c) cromosoma pegajoso y rezagado con puentes d) cromosoma rezagado y pegajoso e) anafase anormal f) cromosoma rezagado g) cromosoma vagabundo, puente y cromosoma rezagado, h) puente y cromosoma vagabundo, l) puentes.

La prueba con *Allium spp.* es un biomodelo adecuado para identificar efectos citotóxicos y genotóxicos de diversas plantas (Trapp et al. 2020, Bagatini et al. 2007, Lubini et al. 2008). El estudio de los extractos crudos es de relevancia debido a que en medicina tradicional se utiliza alguna estructura (hojas, tallo, raíz) o la planta completa, sin separar sus componentes, asimismo, se ha demostrado que diferentes compuestos bioactivos actúan sinérgicamente (Tallarida, 2011) incluso se ha demostrado que la combinación de compuestos exhibe mayor actividad que los compuestos individuales, por lo cual se ha indicado que los efectos de algunas plantas resultan de la interacción de sus componentes (Lamy et al. 2018).

En este estudio los análisis cualitativos (pruebas fitoquímicas; FTIR) de la planta mostraron presencia de alcaloides, taninos, saponinas, y flavonoides. La espectroscopia utilizada proporciona información importante sobre grupos funcionales, además de que es una técnica accesible y útil en el análisis químico y estructural de las plantas (Günzler and Gremlich, 2002, Heredia-Guerrero et al. 2014). El grupo funcional que se asocia a las señales reportadas en los espectros evaluados (FTIR) corresponde a flavonoides, los cuales presentan actividad inhibitoria contra diversas especies de hongos y bacterias. Respecto a los metabolitos reportados (alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides) se les atribuye actividad antimicrobiana, antioxidante, antiviral, entre otras (Roschek et al. 2009; Sidor et al. 2014. Zhu et al. 2015). En particular, los flavonoides exhiben importantes actividades farmacológicas, además de ser eficaces en la quimio prevención y la quimioterapia (Paduch et al. 2007, Perveen, 2018).

La evaluación del extracto *S. canadensis* utilizando el test *Allium sativum* permitió determinar efectos en el crecimiento de raíces y tallo, así como en la morfología; las concentraciones más altas 1000 y 1500 mg/L inhibieron el crecimiento de las raíces y el tallo significativamente en comparación con el control. Respecto al índice mitótico (IM), disminuyó significativamente al aumentar la concentración de *Sambucus canadensis*, lo cual coincide con lo reportado para otras especies de *Sambucus sp* (Tedesco et al. 2017, Thole, 2006) otros autores han reportado que extractos vegetales como *P. leiocarpa* y *P. myriantha* (Lubini et al., 2008) *Campomanesia xanthocarpa* (Pastori et al.,2013) *Vernonanthura polyanthes*

(Almeida et al., 2020) *Amaranthus spinosus* (Prajitha y Thoppil, 2016) *Achyrocline satureioides* (Fachinetto et al. 2007) *Luehea divaricata* (Frescura et al. 2012) causaron una reducción en el índice mitótico al aumentar la concentración, lo cual podría indicar una actividad anti proliferativa tal como lo han reportado Bagatini et al. (2009) Knoll et al. (2006) . Los resultados obtenidos en este estudio pueden asociarse a los componentes de las plantas, en este sentido los flavonoides encontrados en análisis de FTIR pueden inhibir o estimular el ciclo celular. Tedesco et al. (2017) encontró que *Sambucus australis* tiene flavonoides como rutina, kaempferol, quercetina entre otros, a los cuales se les atribuyen diferentes efectos farmacológicos, como la acción anti proliferativa y anticancerígena. Un estudio desarrollado por Lee and Finn, (2007) reportó que *Sambucus canadensis* presenta una alta cantidad de antocianinas y polifenoles los cuales tienen un efecto antioxidante potente, lo que también puede explicar la inhibición en la división celular en *Allium sativum*. Del mismo modo los componentes fenólicos que contiene la especie se han asociado a una actividad anticancerígena más potente que la de especie *Sambucus nigra* (Thole et al. 2006). Respecto a las principales aberraciones cromosómicas encontradas en este estudio se puede observar la formación de puentes, de acuerdo con Türkoğlu (2007) los puentes se producen debido a la unión de cromosomas o cromátidas como resultado de la adherencia cromosómica o debido a una translocación desigual, también los cromosomas rezagados al moverse a ambos lados de los polos sin estar unidos por el huso mitótico puede inducir puentes, otra aberración que se encontró en los resultados de esta investigación fueron cromosomas pegajosos, éstos se forman por el movimiento libre de cromosomas lo cual puede generar rotura de cromosomas y puede conducir a la pérdida de material genético (Dutta et al., 2018). Los cromosomas vagabundos avanzan por delante del grupo cromosómico hacia los polos resultando en una distribución desigual de cromosomas en las células hijas (Sondhi et al. 2018). Asimismo, Fachinetto y Tedesco (2009) atribuyen diversas anomalías cromosómicas, puentes, células binucleadas, entre otras a los componentes de las plantas. A este respecto, Toloza et al. (2006), Bagatini et al. (2009) indican que la actividad genotóxica, así como anti proliferativa que presentan

algunos extractos vegetales son el resultado de las interacciones de sus diversos componentes químicos. A este respecto Amado et al. (2020) reportó que el extracto de *Smilax brasiliensis* y las fracciones rutina y quercetina los cuales también se han encontrado en la especie de *Sambucus sp.* son causantes de efectos genotóxicos. Se ha indicado que, si los extractos provocan daños en los cromosomas de las células vegetales, puede ser potencialmente peligroso también para los cromosomas de células mamíferas (Feretti et al. 2007). De acuerdo con los resultados encontrados, en concentraciones bajas 125 mg/L, 250 mg/L no se presentan anomalías en la raíz de *A. sativum*, sin embargo, en las concentraciones 500, 1000 y 1500 mg/L se encontró un número importante de alteraciones tales como puentes, cromosomas rotos, vagabundos, por tal razón se puede indicar que el extracto presentó efecto genotóxico a altas concentraciones. Los resultados de esta investigación coinciden con lo reportado por Bratu (2012) el cual indica que la especie *Sambucus nigra* en concentraciones bajas no presentó efectos mutagénicos. De acuerdo con Ifeoluwa et al. (2013) y Sabini et al. (2011) algunas plantas inducen citotoxicidad, pero no efectos mutagénicos. En general, las frecuencias de las aberraciones aumentaron significativamente al aumentar la concentración, por lo cual podemos indicar que las hojas del extracto de *Sambucus canadensis* mostró efectos clastogénicos, lo cual coincide con lo reportado por Bidau et al. (2004) Çelik y Aslantürk, (2010) Mattana et al., (2014) sobre los efectos de hierbas medicinales. *Sambucus canadensis* es una planta que debe utilizarse con cautela no sólo por ser empleada para curar enfermedades sino también porque es utilizada por mujeres embarazadas (Velazquez-Vázquez et al. 2019) lo cual podría inducir daños en su salud. El uso de plantas antes y después del embarazo puede generar desde vómitos, infecciones, problemas gastrointestinales, hasta retención de placenta, desgarro cervical, aborto, sangrado uterino entre otras, debido a que existen pocos estudios sobre la seguridad y eficacia del uso de hierbas durante el embarazo y se expone tanto a la madre como al feto, se recomienda no utilizarlas si no se cuentan con estudios científicos que validen su seguridad (Ahmed et al. 2017, Hall et al. 2011, Illamola et al., 2020, Frawley et al., 2015, Nergard et al. 2015).

5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO VEGETAL *SAMBUCUS CANADENSIS* FRENTE A CEPAS AISLADAS DE ALIMENTOS ECOLÓGICOS

En esta fase se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto vegetal frente a cepas pertenecientes a la colección del laboratorio de Microbiología de los alimentos. La actividad antimicrobiana de los compuestos se evaluó con cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y con cepas previamente aisladas a partir de alimentos orgánicos (Fernández-Fuentes et al., 2012). Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se diluyeron en serie en caldo de soja tríptico (TSB) (Scharlab, Barcelona, España) para ensayos de antimicrobianos y antibiofilm o antibiopelículas, las cepas pertenecían a 2 tipos de colecciones cepas de la colección y cepas resistentes aisladas de alimentos ecológicos se enumeran en la Tabla .

Tabla 16. Cepas utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana y anti-biopelícula perteneciente a dos tipos de colecciones del Laboratorio de Microbiología de los alimentos.

<i>Bacterias de la colección del laboratorio de Microbiología de Alimentos</i>	
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 915
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4300
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4395
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47553
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47557
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 976
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 4465
<i>Cepas resistentes aisladas de alimentos orgánicos</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	UJA 277
<i>Enterococcus faecium</i>	UJA 11c
<i>Lactobacillus casei</i>	UJA 35h
<i>Enterobacter sp.</i>	UJA 37p
<i>Pantoea agglomerans</i>	UJA 29o
<i>Klebsiella terrigena</i>	UJA 32j

En la primera fase se realizaron ensayos de detección de actividad antimicrobiana en pruebas estándar de difusión en agar para obtener las concentraciones óptimas de cada compuesto que se utilizará en las pruebas de CIM y para identificar las bacterias con las que se presentaba mayor actividad antimicrobiana. Los ensayos antimicrobianos se realizaron en concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se realizaron las pruebas en microplaca para determinar los valores mínimos de concentración inhibitoria mediante el método de microdilución en caldo (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.) Según lo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para obtener los datos de CMI.

Se analizó el extracto vegetal diluido en serie en un rango de 100 a 0.01 $\mu\text{g/ml}$, según el valor de MIC obtenido previamente, para determinar la capacidad de los compuestos para obstruir la formación de biopelículas y también su potencial para interrumpir biopelículas previamente formadas, como lo describen Ulrey et al. (2014). La inhibición de la formación de biopelículas inducida por compuestos aislados se midió mediante el método de tinción de violeta cristal descrito por Djordjevic et al. (2000) con algunas modificaciones. Posteriormente se incubaron suspensiones bacterianas (10^6 UFC en TSB) con concentraciones crecientes del extracto (24 h, 30 C). Los pocillos con suspensiones bacterianas y medio TSB se ejecutaron en paralelo como controles positivos para la formación de biopelículas. Todos los pozos se lavaron con agua del grifo y las biopelículas se fijaron con metanol. La placa se tiñó con violeta de cristal al 0,3% y se leyó en un iMarkMicroplate Reader (Bio-Rad, Madrid, España) D0 595 nm.

Los resultados para las bacterias de la colección del laboratorio de Microbiología fueron variables de acuerdo con las cepas, para el caso de *S. entérica* CECT 915 en la concentración de 1.0 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvieron diferencias significativas respecto al control $p=0.0335$. Para el caso de *S. entérica* CECT 4395 en las concentraciones de 1 y 0.10 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvieron valores de 31 y 35% respectivamente siendo estadísticamente significativo $P<0.0001$

Para *S. entérica* CECT 4300 los valores más bajos de formación de biofilm (49 y 50%) se lograron en las concentraciones más bajas 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$ pero no

mostraron significancia estadística $P=0.1542$. En el caso de *S. entérica* CECT 405 se obtuvieron valores estadísticamente significativos (37 y 32 % $P<0.0001$) en concentraciones bajas de 1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$, las concentraciones más altas de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ tuvieron porcentajes alrededor del 50%. Para el caso de las bacterias *E. coli* CECT 4757 no se encontraron diferencias significativa $p=0.1525$, el mayor porcentaje de inhibición fue mayor al 50%. Sin embargo, con la cepa *E. coli* CECT 4753 en la menor concentración 0.01 se redujo hasta en un 39% la formación de biofilm siendo estadísticamente diferente respecto al control $p=0.0017$. Para las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* 4475 se logró una inhibición en la formación del biofilm del 33% y 41% en las concentraciones más bajas, ambas cepas mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control $p<0.0001$ y $p=0.0391$ respectivamente.

Para el caso de las bacterias resistentes aisladas de alimentos ecológicos la cepa *Enterococcus faecium* 11c tuvo menor formación de biofilm en la concentración más baja 0.01 $\mu\text{g/ml}$ los resultados fueron estadísticamente significativos ($P=0.106$). La cepa *Pantoea* 29j tuvo porcentajes de formación del 35%; 10 $\mu\text{g/ml}$ $p=0.0007$. *B. cereus* redujo hasta en 23% la formación de biofilm $P<0.0001$. Sin embargo, la cepa de *Klebsiella* 32j tuvo menor formación de biofilm en la mayor concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (47%) los resultados fueron estadísticamente significativos respecto al control $P=0.0025$. *L. cassei* redujo hasta en un 17% la formación de biofilm en las concentraciones más altas con resultados estadísticamente significativos $P=0.0030$. Por otro lado, *Enterobacter* 37p no tuvo resultados favorables la menor formación de biofilm fue de 71% $p=0.1453$ (figura 37). Respecto a los resultados en la disgregación del biofilm, se puede observar que en algunas bacterias se logró una disrupción de la biopelícula previamente formada de hasta 30% (Tabla 2). Aunque en algunas cepas no se logró reducir la formación de biofilm. Respecto a las bacterias pertenecientes a la colección del laboratorio de Microbiología *S. entérica* CECT 915 se obtuvieron porcentajes de disgregación del 34% $p<0.05$ en concentraciones de 0.10 $\mu\text{g/ml}$. Para el caso de *S. entérica* 4357 también se tuvo disgregación de biofilm de 40% en la misma concentración. Por otro lado, para la cepa *S. entérica* CECT 4300 no se logró disgregación de biofilm. Para la cepa *E.*

coli 4757 se alcanzó hasta un 24% de disgregación en la concentración más baja de 0.01 ug/ml siendo estadísticamente significativo respecto al control $P < 0.0001$. Para el caso de las bacterias *S. aureus* CECT 975 y *S. aureus* CECT 4465 se logró una disgregación de 30 y 24% a las concentraciones más bajas de 0.1 y 0.10 ug/ml siendo estadísticamente significativo $p < 0.05$. Para el caso de las bacterias resistentes en *E. faecium 11c* las concentraciones intermedias mostraron diferencias estadísticamente significativas en la disgregación del biofilm $p = 0.0019$. Por otro lado, la cepa de *Pantoea 29j* disgrega hasta en un 35% $p < 0.05$ en la concentración más baja de 0.01 ug/ml. Similares resultados se pueden observar para *Enterobacter* sp. 37p.

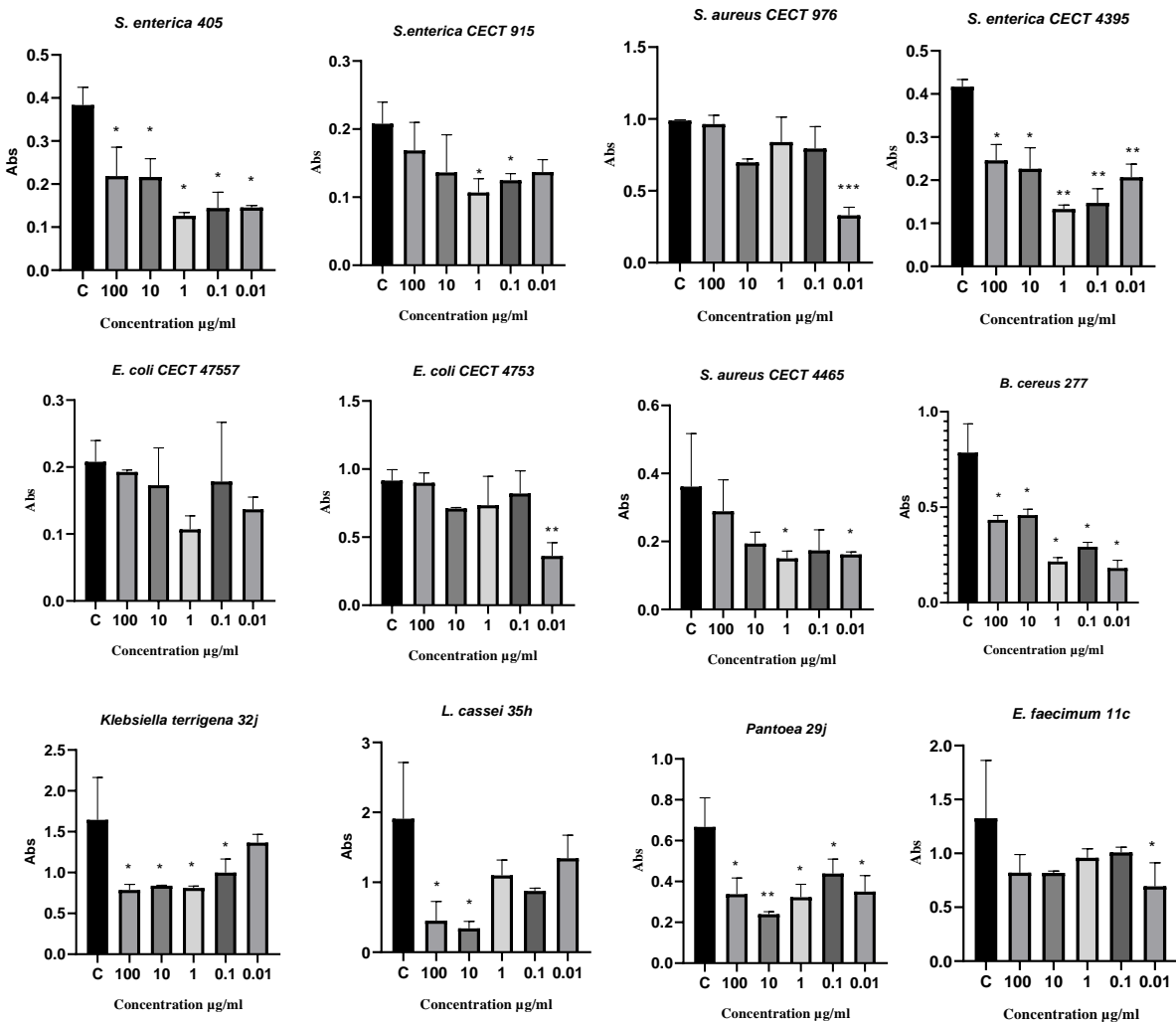


Figura 38. Resultados de la formación de biopelículas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

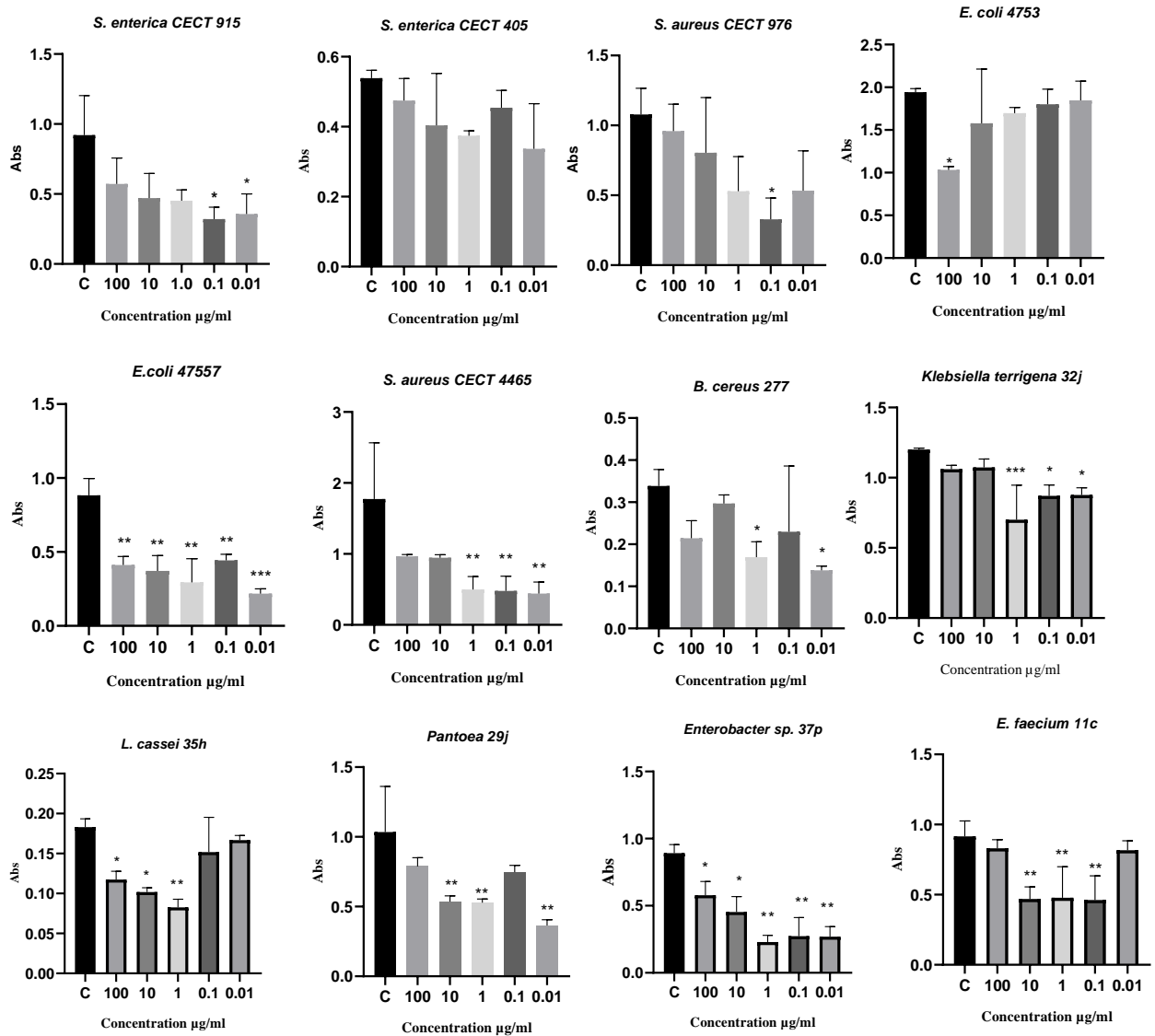


Figura 39. Resultados de la disgregación de biopelículas previamente formadas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

La alta resistencia desarrollada por las biopelículas bacterianas a los antibióticos y biocidas varía de un organismo a otro, por lo tanto, su erradicación no es fácil. Reducir la capacidad de que las bacterias formen biopelículas es fundamental para poder aplicar un tratamiento más eficaz (Dean et al., 2011, Ulrey et al., 2014). Algunos estudios desarrollados con productos naturales han demostrado que podrían ser eficaces contra las biopelículas bacterianas (Upadhyay et al., 2013, Alejo-Armijo et al., 2017, Vasudevan, 2014). A este respecto Budri et al. (2015) reportó una fuerte actividad anti-biopelícula de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*. Cha et al. (2004) también mostró que los aceites esenciales de *Artemisia lavandulaefolia*, tienen efectos inhibidores sobre 15 cepas de bacterias anaerobias entre las que se encuentran *S. aureus*, *Enterobacter sp.* entre otras. Yatsuda et al. (2005) encontró que los extractos de *Mikania laevigata* y *M. glomerata* inhibían significativamente la adherencia celular de *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. cricetus*. Del mismo modo, Veloz et al. (2005) mostró que los extractos de polifenoles de *Chilean propolis* inhiben un 50% la formación de biopelículas de *S. mutans*. En este estudio se encontró que el extracto vegetal de *Sambucus canadensis* presenta resultados favorables frente a la formación de biopelículas y la disgregación de películas previamente formadas, estos resultados se presentaron tanto en bacterias de cultivo tipo como resistentes. Para el caso de algunas bacterias se encontró inhibición significativa pues hubo reducción menor al 30% e incluso aumento en la capacidad de formación de biopelículas dependiendo de la concentración probada. *B. cereus 277* y *S. aureus CECT 976* obtuvo los menores porcentajes de formación de biofilm (30%, $p < 0,05$). Para el caso de la formación de biofilm de la bacteria *S. entérica CECT 4465*, *Klebsiella terrígena 32j* y *L. cassei 32h* se presentó una dosis dependiente, induciendo una disminución de 43 a 55% de 47% a 83% y de 23 a 70.4% respectivamente aumentando cuando la concentración incremento de 0.01 a 100 $\mu\text{g/mL}$. La dosis dependiente encontrado en la formación de biofilm ha sido reportada por microorganismos que afectan los alimentos (Rane et al., 2014, (Alejo-armijo et al., 2016). Por otro lado, también se encontraron resultados en los cuales a menor concentración mayor actividad anti biopelícula, en otros estudios también se han reportado efectos paradójicos; menor

formación de biofilm en concentraciones más bajas Rane et al (2014) al estudiar el efecto de los PAC de arándano sobre la formación de biopelículas de *C. albicans* encontró que las dosis altas de PAC de arándano no tuvieron un efecto significativo ($P > 0,05$) sobre la actividad de *C. albicans* pero si las dosis más bajas, también se había observado un efecto paradójico dependiente de la cepa y del fármaco (Melo et al., 2007). Posteriormente, en el experimento de disgregación cuando se permitió que las bacterias se adhieran y formen biopelículas, los mejores resultados se encontraron con la bacteria *S. aureus* que indujo una reducción del 24,8% ($p < 0,05$) a 0,01 ug / ml, en comparación con el control. También se detectó una reducción significativa ($p < 0,05$) del 35.2% en el biofilm preformado con *Pantoea 29j* a la misma concentración. Asimismo, en *Enterobacter sp 37p* se redujo en 25% en una concentración de 1 ug/ml $p = 0.05$. También se detectaron reducciones menores en concentraciones de 1 y 10 ug/ml. Los resultados encontrados en el estudio pueden asociarse a los compuestos de las plantas; por ejemplo, los polifenoles tienden a autoasociarse cuando aumenta la concentración (Charlton et al., 2002). También las estructuras externas de las bacterias Grampositivas y Gram-negativas pueden ser responsables del efecto dosis-dependiente. Los metabolitos secundarios de las plantas tienen diversas propiedades biológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiano, modulación de enzimas, entre otras (Kurmukov et al., 2013) y se les puede asociar la actividad de formación y disgregación encontrada en este estudio.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES GENERALES

En la primera etapa de esta tesis se realizó un estudio etnobotánico en el cual la mayoría de las personas que tenían conocimientos 79.5% eran mujeres, lo cual denota el rol y preponderancia que tiene la mujer en el conocimiento sobre las plantas medicinales y sus usos en la medicina tradicional.

Los rangos de edades de los entrevistados indican que existe una tendencia a la apropiación del conocimiento por parte de adultos, del sexo femenino y en menor medida por parte de jóvenes. En el estudio realizado se reportaron 43 especies de plantas de uso medicinal pertenecientes a 21 familias botánicas. Las familias mejor representadas fueron Asteraceae, Lamiaceae y Rutaceae, el resto de las familias estuvieron representadas por dos y una especie. En cuanto a la obtención, la mayoría de las personas indicó que obtienen las plantas de la propia comunidad, incluso un importante porcentaje de los encuestados (68%) cultiva las plantas en huertos. Los índices valor de uso y frecuencia de uso reflejan la realidad circundante del conocimiento local que posee la población rural en cuanto a la biodiversidad de especies de plantas con algún uso medicinal.

Las plantas seleccionadas para este estudio se basaron en la revisión de literatura en donde se tienen escasos conocimientos sobre actividad antibacteriana y genotóxica de las plantas seleccionadas.

En este estudio se mostró que los extractos vegetales de *Ricinus communis*, *Salvia microphylla*, *Sambucus canadensis* y *Bidens alba*, plantas utilizadas en medicina tradicional tienen efectos antimicrobianos frente a bacterias patógenas. Estos resultados se asocian a la presencia de los metabolitos encontrados en esta investigación.

Las pruebas *in vitro* e *in vivo* revelaron que los extractos fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de las bacterias evaluadas. Por tanto, se puede indicar que los extractos de las plantas utilizados como medicina tradicional en comunidades indígenas de la Sierra Negra tienen efectos contra bacterias de interés alimenticio y pueden ser una alternativa para combatir bacterias transmitidas en los alimentos.

Los resultados de este estudio sugieren que el extracto etanólico de *Sambucus canadensis* induce efectos anti proliferativos, además se encontró que en concentraciones superiores a 500 mg/L influye sobre el crecimiento radicular, división celular y alteraciones cromosómicas en las células de *Allium sativum*. Es importante conocer los efectos de las plantas que son utilizadas como principal fuente de atención médica, para poder aportar hacia la regulación sobre su uso y consumo como una medida importante para proteger la salud de las personas.

Se recomiendan hacer más pruebas con otras bacterias de interés para evaluar la eficacia de las plantas analizadas en este estudio. Asimismo, es importante evaluar los metabolitos para detectar si la actividad bacteriana o genotóxica está relacionada con un metabolito o por el contrario la actividad es debido a la sinergia de los compuestos de la planta, lo cual ha sido reportado anteriormente.

En este estudio se aceptó la hipótesis general de que existen extractos vegetales con propiedades antibacterianas con la capacidad de inhibir bacterias. También se aceptó la hipótesis que algunos de los extractos seleccionados tuvieron efecto en las bacterias evaluadas, así como los metabolitos. Se acepta la hipótesis alterna ya que el extracto vegetal evaluado si presento genotoxicidad a altas concentraciones. El biomodelo *Allium sativum* fue un bioindicador adecuado para evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad del extracto evaluado.

Este es el primer registro del cual se tiene conocimiento sobre plantas usados en comunidades indígenas den la Sierra Negra de Puebla México en condiciones in vitro e in vivo, así como estudios genotóxicos. A pesar de los resultados de este trabajo, se necesitan más evaluaciones para generar un producto de origen natural que sea útil para desinfectar alimentos contaminados por bacterias. Debido a esto, se recomiendan hacer más pruebas con dosis más altas y diferentes alternativas de aplicación para la obtención de un producto final que pueda llegar a ser comercializado. Se recomienda realizar un estudio más amplio sobre la genotoxicidad de los metabolitos asociados a la especie vegetal evaluada para tener un producto que además de eficaz sea inocuo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Albuquerque UP, Medeiros PM, Ferreira Júnior WS, Silva T, Silva R, Souza TG (2019) Social-ecological theory of maximization: basic concepts and two initial models. *Biol Theory* 14:73–85.

Asela D, Puerto Rodríguez, M. S, Tamayo, S., Daniel, L., & Palacio Estrada, E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387.

Arellano-Aguilar O, Rendón Von Osten J. 2016. La huella de los plaguicidas en México. Greenpeace México A.C.

Arias-Estevéz M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto JC, García-Río L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems & Environment*. 123: 247-260.

Badii MH, Varela S. 2008. Insectidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. *Culcyl/Toxicología de Insecticidas*. 28: 5-17.

Bailey KL, Boyetchko SM, Längle T (2010). Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biol. Control*, 52: 221-229.m

Briceño G, Fuentes MS, Palma G, Jorquera MA, Amoroso MJ, Diez MC. 2012. Chlorpyrifos biodegradation and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 73:1-7

Benton T. G., Bryant D. M., Cole L. & Crick H.Q.P., 2002. Linking agricultural practice to insect and bird populations: a historical study over three decades. *Journal of Applied Ecology* 39(4):673–687.

Castañeda, E., Ventura, R., Peniche, V. & Herrera, G. (2007). Analysis and simulation of a greenhouse physical model under weather conditions of the central region of Mexico. *Agrociencia*, 41(3), 317-335.

Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2010). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97–106.

Cortes J, Sánchez R, Díaz-Plaza E, Villen J, Vázquez A. 2006. Large Volume GC Injection for analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using through over transfer adsorption desorption (TOTAD) Interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1997-2002.

Cruz-Reyes y Pickering-López, J.M., 2006. "Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years". A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(4): 345-354.

Cheng XL, Liu CJ, Yao JW (2010). The Current Status, Development Trend and Strategy of the Bio-pesticide Industry in China. *Hubei Agric. Sci.* 49: 2287-2290.

Devine G.J. & Furlong M.J., 2007. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values* 24, 281-306

Del Campo, A., & Coletto, R. (1998). Capacidad genotóxica de la hidrácida maleica (MH) detectada por intercambio de cromátidas hermanas (SCE) y por otros bioensayos en *Allium cepa*. *Ciencia*, 6(1), 7–21.

Espinel C., Torres L., Grijalba E., Villamizar L., Cotes A.M. 2008. Preformulados para control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*. 34: 22–27

García-de-León, S. y T. Mier. 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 10(20): 37-63

García-Gutiérrez C. y González Maldonado M. B. 2006. Síntesis sobre el uso de bioinsecticidas y otros agentes de control biológico de plagas en México. *Vedalia* 14 (1): 35-42 (2013)

González-Acosta A. Pozo-Núñez E.M., Galván Piña B., González-Castro A. González-Cárdenas J.C. 2006. Extractos vegetales y aceites minerales como alternativa de control de mosca blanca (*Bemisia* spp.) en berenjena (*Solanum melongena* L.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista UDO Agrícola* 6 (1): 84-91.

Gutiérrez JA, Pinzón MI, Londoño A, Blach D, Rojas AM. 2011. Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados y análisis fisicoquímico en piña (*Ananas comosus* L.). *Agro Sur*. 38(3):199-211.

Geck MS, Cabras S, Casu L, Reyes García AJ, Leonti M (2017) The taste of heat: how humoral qualities act as a cultural filter for chemosensory properties guiding herbal medicine. *J Ethnopharmacol* 198:499–515

Hernández-León R, Velázquez-Sepúlveda, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G. 2010. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 79: 133-139.

Heaney S.I., Foy R.H., Kennedy G.J.A., Crozier W.W. & O' Connor W.C.K., 2001. Impacts of agriculture on aquatic systems: lessons learnt and new unknowns in Northern Ireland. *Marine and Freshwater Research* 52(1):151–163

Hynes, R. K. & S. M. Boyetchko. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil biology and Biochemistry* 38: 45-849

Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI) (2007). VII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal (Comunicado número 088/09). Aguascalientes, Ags: INEGI.

Montero R., Pérez- Arnáez G, Fernández- Esperón N, Bada A.M, Arteaga- Pérez M.E. 2001. Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Toxicología*, 18, 75–78.

Molina, N. 2001. Uso de extractos botánicos en el control de plagas y enfermedades. pp. 56-59. En: Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo integrado de plagas. CATIE, Costa Rica.

Muiño, E., Botta, E., Pérez, A., Ballester, D., Moreno, F., Rodríguez, E., Fernández R. (2007). Sistemas de manejo integrado de plagas como alternativa al uso del bromuro de metilo en la producción de cultivos protegidos, flores y ornamentales. *Boletín Fitosanitario* 12(1): 1-71

Naumann, K.; M. B. Isman: «Toxicity of Neem (*Azadirachta indica* A. Uss.) Seed Extracts to Larval Honeybees and Estimation of Dangers from Field Applications», 1996. *Am. Bee. J.* 136: 518-520, EE. UU.,

Ortega Martínez LD, Martínez Valenzuela C, Huerta de la Peña A, Ocampo Mendoza J, Sandoval Castro E, Jaramillo Villanueva JL. 2014. Uso y manejo de plaguicidas en invernaderos de la región norte del estado de Puebla, México.

Ortiz I. Avila-Chávez M.A. Torres L. G. 2014. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal.* 4; 1:24-26

OCAMPO, Rafael, & MORA, Gerardo (2010). Las Plantas Medicinales de América Latina como Materia Prima ¿Cuál es, o debería ser su papel?. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(5),323-325.[fecha de Consulta 12 de Abril de 2021]. ISSN: 0717-7917. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85615225001>

Ramírez JA, Lacasaña M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor.* 4(2):67-75

Pasiani JO, Torres P, Silva JR, Diniz BZ, Caldas ED. 2012. Knowledge, attitudes, practices and Biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 9(9): 3051-3068.

Perez-López E. 2012. Plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad.* 16. 51-59.

Ribeiro MG, Colasso CG, Monteiro PP, Pedreira Filho WR, Yonamine M. 2012. Occupational safety and health practices among flower greenhouses workers from Alto Tiete region (Brazil). *Science of the Total Environment.* 416: 121-126.

Sánchez-Alarcón, Pérez-Lara, A.P. Tenorio-Arvide G. Youjun Deng, Gómez-Arroyo S, & Flores-Márquez A.R, Villalobos-Pietrini R, y Valencia-Quintana R. 2014. Inducción de daño al ADN en células meristemáticas de por Aflatoxina B1 la raíz de *Vicia faba* var. minor. *Ciencia Y Tecnología de La UACJ, XII*, 47–54.

Rios, M. 2012. Evaluación participativa de impactos de los plaguicidas utilizados en soja y forestación en un área protegida y su cuenca. Universidad de la Republica. Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/3977/1/uy24-15946.pdf>

Valencia-Quintana R. Sánchez-Alarcón J. Gómez-Arroyo S. Cortes-Eslava J. Waliszewski S.M. Fernández S. y Villalobos-Pietrini R. 2013. Genotoxicidad de plaguicidas

en sistemas vegetales. *Revista Internacional de Contaminación*. 29: 133-157.

Villavicencio-Nieto M.A. Pérez-Escandón B.E. 2010. plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotanica*, 30:193-238.

Wesseling, C., Aragón, A., Castillo, L., Corriols, M., Chaverri, F., de la Cruz, E., Keifer, M., Monge, P., Partanen, T., Ruedert, C. y van Wendel de Joode, B, 2003. "Consideraciones sobre plaguicidas peligrosos en América Central". *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 68: 7-18

Benz BF, Cevallos J, Santana F, Rosales J, Graff M (2000) Losing knowledge about plant use in the Sierra at the Manantlan Biosphere Reserve, Mexico. *Econ. Bot.* 54: 183-191

Katewa S, Chaudhary B, Jain A (2004) Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *J. Ethnopharmacol.* 92: 41-46

Joshi A, Joshi K (2000) Indigenous knowledge and uses of medicinal plants by local communities of the Kali Gandaki Watershed Area, Nepal. *J. Ethnopharmacol.* 73: 175-183.

Pešić, M. (2015). Development of natural product drugs in a sustainable manner Brief for GSDR 2015. Retrieved from https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/6544118_Pesic_Development%20of%20natural%20product%20drugs%20in%20a%20%20sustainable%20manner.pdf

Bauer, A. , & Brönstrup, M. (2014). Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Natural Product Reports*, 31(1), 35–60. 10.1039/C3NP70058E [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Pour, P. M. , Fakhri, S. , Asgary, S. , Farzaei, M. H. , & Echeverría, J. (2019). The signaling pathways, and therapeutic targets of antiviral agents: Focusing on the antiviral approaches and clinical perspectives of Anthocyanins in the Management of Viral Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1–23. 10.3389/fphar.2019.01207 [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Ghosh P, Dutta A, Biswas M, Biswas S, Hazra L, Nag SK, Sil S, et al. Phytomorphological, chemical and pharmacological discussions about *Commelina benghalensis* Linn. (Commelinaceae): A Review. *The Pharma Innovation Journal*. 2019; 8(6):12-18. 7. Ghosh P, Das C, Biswas S, et al. Phytochemical Composition Analysis and Evaluation of In Vitro Medicinal Properties and Cytotoxicity of Five Wild Weeds: A Comparative Study. *F1000Research*, 2020, 9:493.

Bidens Alba. Monografía, 2001. URL disponible en: <http://www.Florida.com/ref/b/bide-alb.cfm> 5. Lastra H, Rodríguez E, Ponce de León H, González ML. Método analítico para la cuantificación de Bides taninos en el extracto acuoso de Romerillo. *Rev Cubana Plant Med* 2000; 5(1):17-22.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP (2000) Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 21: 510–515.

Albuquerque, U. P., do Nascimento, A. L. B., Silva Chaves, L., Feitosa, I. S., de Moura, J. M. B., Gonçalves, P. H. S., ... Ferreira Júnior, W. S. (2020). *The chemical ecology approach to modern and early human use of medicinal plants*. *Chemoecology*. doi:10.1007/s00049-020-00302-8

Farfan, M., Min˜ana-Galbis, D., Fuste´, M. C. & Lore´n, J. G. (2002) *J. Bacteriol.* 184, 1304–1313,

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP (2000) Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 21: 510–515.

Hardy BL, Moncel M, Despriée J, Courcimault G, Voinchet P (2018) Middle Pleistocene hominin behavior at the 700 ka Acheulean site of la Noira (France). *Quatern Sci Rev* 199:60–82

Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS (2002) Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417: 746–750.

Dunny GM, Clewell DB (1975) Transmissible toxin (hemolysin) plasmid in *Streptococcus faecalis* and its mobilization of a noninfectious drug resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 124: 784–790.

Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, et al. (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302: 1569–1571.

Shepard BD, Gilmore MS (2002) Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes. Infect.* 4: 215–224.

Domínguez-Pérez, L. A., Lagunes-Gálvez, L. M., Barajas-Fernández, J., Olán-Acosta, M. A., García-Alamilla, R., & García-Alamilla, P. (2019). Caracterización vibracional de grupos funcionales en granos de cacao durante el tostado usando espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier. *Aniversitaria* 29, e2172. doi. <http://doi.org/10.15174.au.2019.2172>

Acevedo L., Mendoza C. y Oyon R. (2001). Total and fecal coliforms, some enterobacteria staphylococcus sp and mould in salads for hot dogs sold in Maracay, Venezuela. *Etnopharmacology* 5 1 (4) 366-370.

Azqueta A, Pereira-Wilson C, Collins AR. 2010. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J Agric Food Chem.* 58: 7465-7471.

Batz MB, Hoffman S, Morris JG. 2011. Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with the Greatest Burden on Public Health. Health. University of Florida, Emerging Pathogens Institute, Gainesville.

Baris O, Gulluce M, Sahin F, Ozer H, Kilic H, Ozkan H, Sokmen M, Ozbek T 2006. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea Biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turkish Journal of Biol.* 30: 65-73.

Beuchat LR. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 2002.4:413-23

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods —a review. *Int J Food Microbiol.* 94: 223-253

Carvajal Rojas L., Hata-Uribe Y., Sierra- Martínez N., Rueda Niño D. 2009. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*strychnos schultesiana* krukoff. *Revista Colombia Forestal* Vol. 12: 161-170

Castro J, Rojas M., Noguera Y., Santos E.M., Zúñiga A., Gómez C.A. 2006. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. *Industria Alimentaria* 9-21

Caceres, A., Cano, O., Samayoa, B. & Aguilar, L., (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of Gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 30, 55-73.

Cos P, Vlietinck AJ, Vanden BD, Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of concept'. *Journal of Ethnopharmacology.* 106:290-302.

Cutter CN. 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection* 63(5):601-607

Fazly-Bazzaz BS, Izadyar AR. 2002. Antimutagenic activity of different fractions of *Salvia leriifolia* extract. *Iran J Basic Med Sci;* 4: 241-250.

García-Gómez R., Chávez-Espinosa J., Mejía-Chávez A., Durán-de-Bazúa A. 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 44 (1) 24 - 30

Herrera-Arias, F. C. & Garcia-Rico, R. O. (2006). Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Grupo de Investigación de Ciencias Aplicadas (GICA-UP). Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Universidad de Pamplona. Bucaramanga. Colombia. *Revista Bistua.* Vol. 4 No. 2 Pag: 13-19

Hernández P.L. D. (2003). Actividad inhibitoria y letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. innocua*. Tesis Licenciatura. Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería. Universidad de las Américas Puebla. Mexico. Pag: 5

Herrera-Ruiz M. González-Carranza A., Zamilpa A Jiménez-Ferrer E., ^aHuerta-Reyes M., Navarro-García V., 2011. The standardized extract of *Loeselia mexicana* possesses anxiolytic activity through the γ -amino butyric acid mechanism. *Journal of Ethnopharmacology.* 138 (2) 261-267.

Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X. (2004) Fate of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl Environ Microbiol* 70, 2497–2502.

Jena J y Gupta A, K. 2012. RICINUS COMMUNIS LINN: A PHYTOPHARMACOLOGICAL REVIEW . International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 4 (4) 22-29.

Juneja VK, Dwivedi HP, Yan X. 2012. Novel natural food antimicrobials. Annual Reviews of Food Science. 3:381-403.

Kopper G., Calderón G., Schneider S., Domínguez W., Gutiérrez G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. INFORME TÉCNICO SOBRE INGENIERÍA AGRÍCOLA Y ALIMENTARIA. FAO. 190 pp.

Knezevic-Vukcevic J, Vukovic Gacic B, Stevic T, Stanojevic J, Nikolic B, Simic D. 2005. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis*) and its fractions against UV-induced mutations in bacterial and yeast cells. Arch Biol Sci Belgrade; 57: 163-172.

Mandrell RE. Microbial Safety of Fresh Produce: Enteric human pathogens associated with fresh produce: Sources, transport, and ecology. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologies, Ames, IA. Gravani, eds. 2009.1:5-31.

Miché L. y Balandreau J. (2001). Effects of rice surface sterilization with hypochlorine on inoculated *B. thuringiensis* and *S. aureus*. Appl. Environ. Microbiol. , 3046-3052

Murillo-Alvarez JI, Encarnacion DR, Franzblau SG. 2001. Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (México). Pharmaceutical Biology 39(6):445-449

Navarro García, V. M., Rojas, G., Gerardo Zepeda, L., Aviles, M., Fuentes, M., Herrera, A., & Jiménez, E. (2006). Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*, 44(4), 297–300.

Neira L. Mantilla J.C., Stashenko E., & Escobar P. 2018. Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-Leishmania de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género *Lippia*. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas 17 (1): 68 – 83.

Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Apendice B. De las especificaciones sanitarias. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.

Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. 9 p.

Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. 10 p.

Ocaña-de Jesús RL, AT Gutiérrez-Ibáñez, JR Sánchez-Pale, MD Mariezcurrena-Berasain, G Velázquez-Garduño, A Laguna Cerda, I Rojas Puebla. Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido bajo condiciones de invernáculo en 5

Municipios del Estado de México. Revista Internacional de Botanica Experimental 84: 45-50.

OMS (Organización Mundial de la salud.2017. Cuidados primarios de salud. Relatorio de la Conferencia Internacional sobre cuidados primarios de la salud de Alma Ata. Genova, Suiza

Parrilla Cerrillo M. C., Vázquez Castellanos J.L., Saldate Castañeda E. O., Nava Fernández L. M. 1993. Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y Parasitario. Rev Mex Salud Pública. 35: 456-463.

Perez-Lopez L. (2005) Aislamiento y caracterización de compuestos de plantas del noreste de México con actividad contra cepas de streptococcus pneumoniae, staphylococcus aureus y haemophilus influenzae. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo Leon. 110 p.

SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2011. <http://www.senasica.gob.mx/>.

Somchit MN, Reezal I, Nur IE, Mutalib AR. 2003. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. Journal of Ethnopharmacology. 84(1):1-4.

Sudhakar M, Rao CV, Rao PM, Raju DB. 2006. Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. Fitoterapia 77(1):47-49.

Ukuku O.D., Sapers G.M. 2001. Effect of Sanitizer Treatments on Salmonella Stanley Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-cut Tissues during Cutting Practices. Journal Food Protection 64:1286-1291.

Vega M. C. 2013. Identificación parcial de principios activos de diez plantas medicinales del norte de México con actividad biológica contra bacterias patógenas de aislados clínicos y cepas de referencia. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. 120 p.

Bazargani, M. M., & Rohloff, J., Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms, Food Control (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>

Jain, A., & Parihar, D. K. (2018). Antibacterial, Biofilm Dispersal and Antibiofilm Potential of Alkaloids and Flavonoids of Curcuma. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. doi:10.1016/j.bcab.2018.09.023

Numerous other natural alkaloids have also been reported as “active” to strong inhibitors of biofilm formation (Xie et al., 2012).

Xie, Q.; Johnson, B.R.; Wenckus, C.S.; Fayad, M.I.; Wu, C.D. Efficacy of Berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic Irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. J. Endod., 2012, 38(8), 1114-1117.

Wang, X.Q.; Yao, X.; Zhu, Z.A.; Tang, T.T.; Dai, K.R.; Sadovskaya, I.; Flahaut, S.; Jabbouri, S. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. Int. J. Antimicrob. Agents, 2009, 34(1), 60-66

Fernández-Fuentes, M. A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2012). *Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics*. *Food Control*, 26(1), 73–78. doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.0

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Vol.34. Document M100eS24, No. 3; CLSI: Wayne, PA, 2015

Djordjevic, D.; Wiedmann, M.; McLandsborough, L. A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2950–2958. DOI:10.1128/aem.68.6.2950-2958.2002.

Velázquez-Vázquez G., Perez-Armendariz B., Ortega-Martinez D., Nelly-Juarez Z. 2019. Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas* 18 (3): 265 – 276.

Vélez M., Sánchez M., Bonilla C., Gallo P. 2006. Evaluation of vegetable extracts for control of the pathogenic fungi in banana and strawberry in post harvest storage. *ACTA AGRON (COLOMBIA)* VOL. 55(4) 2006. p 39-44

WHO, 2016. *World Health Statistics 2006*. World Health Organization. Geneva. p. 10-15.

CAPITULO V

5. ARTÍCULO I

CONOCIMIENTO ETNOBOTÁNICO SOBRE EL USO DE PLANTAS MEDICINALES EN LA SIERRA NEGRA DE PUEBLA, MÉXICO.

Del análisis de la información obtenida en este apartado se realizó un artículo científico que se encuentra ya publicado en el Boletín Latinoamericano de Plantas Medicinales y Aromáticas Vol. 18 Número 3 (2019).

Dicha revista se encuentra indexada en AGBIOTECHNET, AGRICULTURAL ECONOMICDATABASE, ANIMAL BREEDING ABSTRACT, ANIMAL PRODUCTION DATABASE, ANIMAL SCIENCE BIBLIOTECA VIRTUAL DA SAUDE (BVS) BIOCONTROL NEWS AND INFORMATION BIOFUELS ABSTRACT, BOTANICAL PESTICIDES ABSTRACT, CAB INTERNATIONAL, CROP PHYSIOLOGY ABSTRACT, ENVIRONMENTAL SCIENCE DATABASE, FIELDS CROP ABSTRACT FOREST SCIENCE DATABASE, GLOBAL HEALTH, HORTICULTURE SCIENCE ABSTRACT HORTICULTURE SCIENCE DATABASE, JOURNAL CITATION REPORTS/SCIENDE EDITION LATINDEX, NAPRALERT, NUTRITION ABSTRACT AND REVIEWS SERIE A: HUMAN AND EXPERIMENTAL, PLANT GENETIC RESORCES ABSTRACT, REDALYC, REVIEW AGRICULTURE ENTOMOLOGY, REVIEW OF AROMETIC AND MEDICINAL PLANT, SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED, SCIMAGO, SCIRUS, SCOPUS, WEB OF SCIENCE, AND RURAL SOCIOLOGY con ISSN: 0717-7917



Artículo Original | Original Article

Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México

[Ethnobotanical knowledge on the use of medicinal plants in the Sierra Negra de Puebla, Mexico]

Guadalupe Velázquez-Vázquez, Beatriz Pérez-Armendáriz,
Luis Daniel Ortega-Martínez y Zaida Nelly-Juárez

Decanato de Ciencias Biológicas, Facultad de Biotecnología, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México
Contactos | Contacts: Guadalupe VELÁZQUEZ-VÁZQUEZ - E-mail address: ghavg@hotmail.com

Abstract: Medicinal plants are very useful for man and is the result of the experience that has accumulated for generations. The aim of the study was to obtain information on the use of medicinal plants used in indigenous communities of the Sierra Negra de Puebla, Mexico. A semi-structured interview was applied to 635 people; 79.5% women and 20.5% men. The use of 43 species divided into 21 families was reported. The most used families were Asteraceae (8 spp.), Lamiaceae (4 spp.) And Rutaceae (4 spp.). The species with higher frequency and use value were *Matricaria recutita* and *Mentha piperita*, the main affections treated were; stomach pain, cough and flu. The leaves were the most used (55%) the main form of preparation (30.2%) was maceration, most (65%) grow the plants in orchards. In indigenous communities, women have a preponderant role in the use of medicinal plants.

Keywords: Medicinal plants; Sierra Negra; Puebla; Ethnobotany

Resumen: Las plantas medicinales son de gran utilidad para el hombre y es resultado de la experiencia que ha acumulado por generaciones. El objetivo del estudio fue obtener información sobre el uso de las plantas medicinales utilizadas en comunidades indígenas de la Sierra Negra de Puebla, México. Se aplicó una entrevista semiestructurada a 635 personas; 79.5% mujeres y 20.5% hombres. Se reportó el uso de 43 especies divididas en 21 familias. Las familias más utilizadas fueron Asteraceae (8 spp.), Lamiaceae (4 spp.) y Rutaceae (4 spp.), las especies con mayor frecuencia y valor de uso fueron *Matricaria recutita* y *Mentha piperita*, las principales afecciones tratadas fueron; dolor estomacal, tos y gripe. Las hojas fueron la parte más utilizada (55%) la principal forma de preparación (30.2%) fue maceración, la mayoría (65%) cultiva las plantas en huertos. En comunidades indígenas la mujer tiene un papel preponderante en el uso de las plantas medicinales.

Palabras clave: Plantas medicinales; Sierra Negra; Puebla; Etnobotánica.

Recibido | Received: 8 de noviembre de 2018

Aceptado | Accepted: 24 de marzo de 2019

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 27 de marzo de 2019

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2019.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: G Velázquez-Vázquez, B Pérez-Armendáriz, LD Ortega-Martínez, Z Nelly-Juárez. 2019 Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 18 (3): 265 – 276.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido de gran utilidad para el hombre no solo porque sirven de alimento, sino también para aliviar y/o controlar enfermedades (Rangel et al., 2001; Martínez-Moreno et al., 2006; Vivot y Cruañes, 2008; Villavicencio-Nieto et al., 2010).

El conocimiento en el uso de las plantas como alternativa en la medicina ha sido una práctica tradicional que se ha transmitido a través del tiempo (Martínez et al., 2006; Pirono et al., 2011). Se estima que al menos 35.000 especies vegetales presentan potencial para uso medicinal y alrededor del 80% de la población mundial utiliza remedios herbolarios tradicionales (Annan y Houghton, 2007; Sotero-García et al., 2018). En los últimos años se ha dado gran importancia al uso de las plantas por ser una alternativa eficaz para combatir enfermedades infecciosas en el hombre con escasos efectos secundarios, así como para evitar problemas de resistencia a los microorganismos debido al excesivo uso de medicamentos de síntesis química (Niño et al., 2006; Miranda-Cruz et al., 2012; Bullain-Galardis et al., 2015).

México se encuentra entre los países con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, debido a la gran diversidad vegetal y amplia riqueza cultural (Barragán, 2006), en este sentido se han registrado más de 4,000 especies para remedios naturales (Gómez-Alvarez, 2012; Kakuko et al., 2005) en distintas afecciones como: bilis, dolor de estómago, riñón, tos, fiebre, gastritis, entre otros (Cáceres et al., 1990; Hernández et al., 2005; Martínez et al., 2006; Castillo-Juárez et al., 2008; Vázquez et al., 2011). El aprovechamiento de las plantas con fines medicinales se ha transmitido de generación en generación, de manera que algunas costumbres subsisten y son ejercidas de forma cotidiana, tanto en zonas urbanas como en comunidades rurales indígenas las cuales son reconocidas por poseer grandes conocimientos tradicionales en el uso de las plantas (Caballero y Cortés, 2001; Leonti et al., 2003). Asimismo, el uso está asociado con la presencia de curanderos, muchos de los cuales poseen un profundo conocimiento de la herbolaria (Canales et al., 2005, Monroy y Castillo, 2007).

Entre los estados en donde se utiliza una amplia variedad de plantas medicinales se encuentra el estado de Puebla (Paredes-Flores et al., 2002; Cruz-García, 2007; Vázquez et al., 2011). Sin embargo, son pocas las investigaciones en el uso y

manejo, puntualmente en comunidades indígenas, por tanto, es escasa la información etnobotánica (Linares et al., 1999; Casas et al., 2001; Dávila et al., 2002, Hernández et al., 2005). Por lo anterior, la información sobre el uso de plantas medicinales en diferentes regiones del país es de gran relevancia etnobotánica y serviría para definir estrategias que mejoren el aprovechamiento y manejo de los recursos de la flora medicinal. Para reconocer estos conocimientos ancestrales, su aplicación y la valoración de sus recursos naturales endémicos, el objetivo de esta investigación fue recabar información del conocimiento popular de las plantas medicinales utilizadas en comunidades indígenas de la sierra Negra de Puebla.

El estudio se realizó durante un periodo de seis meses de enero-julio 2017. Se obtuvo información mediante talleres y encuestas sobre el tipo de planta utilizada, forma de preparación y enfermedades para las que las utilizan.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el municipio de San Miguel Eloxochitlan, se encuentra ubicado al sureste del Estado de Puebla en la Sierra Negra de Puebla en las coordenadas 18°30'32"N y 96°55'22"O a 90 kilómetros del valle de Tehuacán, colinda al norte con el estado de Veracruz, al sur con el municipio de Zoquitlán, al este con el municipio de Porfirio Díaz y al oeste con el municipio de Ajalpan. Tiene una extensión de 190 km². La comunidad de San Miguel Eloxochitlan está conformada por 12575 habitantes de los cuales 6394 son mujeres y 6181 son hombres, 82% de la población cuenta con servicios de salud, sin embargo, 40% de la población carece de educación básica (INEGI, 2010). Su índice de marginación es de 2.26, lo cual lo ubica en el segundo municipio con mayor marginación del estado (CONAPO, 2010). Se estima que más de 9000 habitantes hablan una lengua indígena y que 44% de la población es indígena (SEDESOL, 2012). El clima es templado húmedo con lluvias todo el año, presenta una vegetación de bosques mesófilos de montaña, y pinos y en lo que es el declive hacia la planicie costera la vegetación es selva alta perennifolia. Las localidades de estudio fueron Atexacapa, Mirador, Macuilcouthla, Zacacoapan, Tepepa, Macuiltepec (Figura N° 1).

Los criterios de selección en cuanto a las localidades fueron homogeneidad en características ecológicas y socioculturales. La unidad de análisis

fueron hombres y mujeres adultos. Se realizó una investigación de tipo cuantitativa con un número de muestra de 635 empleando un cuestionario con validación de alfa de cronbach de 0.8 en el que se incluye una parte demográfica y una segunda parte sobre el material herbolario: plantas utilizadas, la forma de obtención, forma biológica, parte de la planta utilizada, enfermedades para las cuales las utilizan y forma de preparación.

Asimismo, con los datos recopilados se obtuvieron los índices de valor de uso (VUis) y frecuencia de uso (Fuso), de acuerdo con Toscano (2006). El índice de valor de uso significa la importancia que posee una especie dada según el grado de uso de la misma y comparada con otras especies.

$$VUis = \sum \frac{\text{frecuencia de la especie}}{\text{Valor max de la especie mas utilizada}}$$

VUis = es el índice de valor de uso de la especie is. Este índice varía entre 0 y 1, siendo 1 la especie con mayor valor de uso.

Frecuencia de uso. Se refiere a las veces en que una especie es utilizada por un usuario (Bravo et al., 2017):

$$F_{uso} = \frac{N^{\circ} P}{N^{\circ} e \times 100}$$

Fuso = frecuencia de uso de la planta medicinal.

N° p = número de veces en la cual se mencionó la especie.

N°e = número total de entrevistas realizadas

Finalmente, se hizo un estudio de campo, las plantas se identificaron por comparación visual con datos de herbarios, manuales, diccionarios botánicos y artículos científicos.

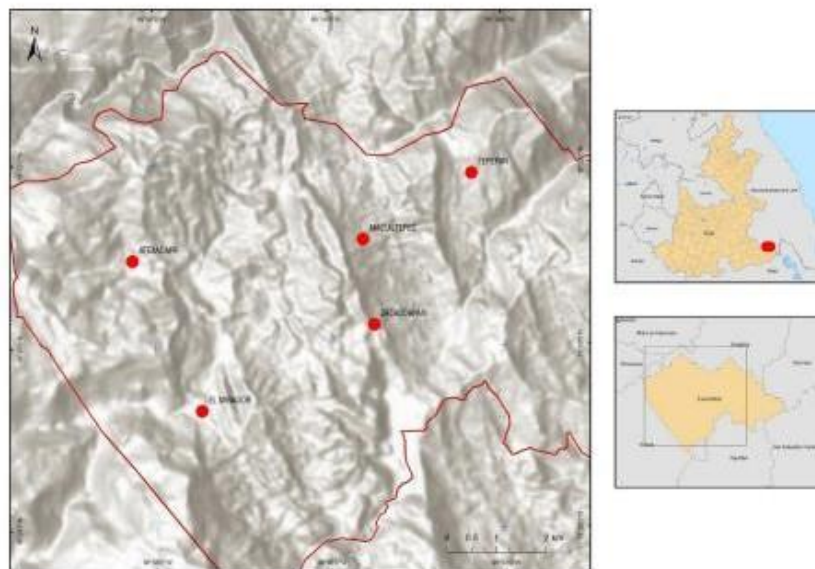


Figura N° 1
Localización geográfica de las comunidades de estudio

RESULTADOS

Se realizaron 635 entrevistas, lo que representa 10% de la población total reportada en cada localidad de acuerdo a los datos del INEGI, 2010. De los entrevistados 79.5% fueron mujeres, con un promedio de edad de 49.5 años, con un mínimo de 18 y máximo de 82 años, el intervalo de edad más frecuente (22.6%) fue de 41-50 años. 20.5% de los

encuestados fueron hombres, la edad promedio fue de 58,4 años, con un mínimo de 21 y máximo de 80, el intervalo de edad más frecuente (27.7%) de los encuestados fue de 60-70 años (Figura N° 2). Asimismo, 70% de los informantes mencionaron haber aprendido el uso de las plantas medicinales de sus padres o abuelos.

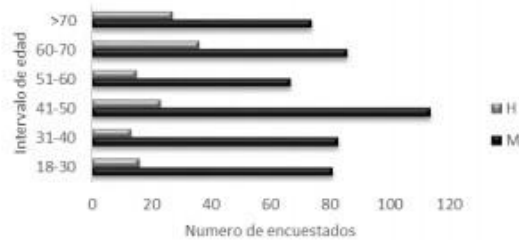


Figura N° 2
Intervalo de edad de mujeres y hombres entrevistados.

Se registraron un total de 43 plantas medicinales agrupadas en 21 familias, entre las que sobresalen: Asteraceae, Lamiaceae y Rutaceae. La familia Asteraceae estuvo representada por 8 especies que corresponden a plantas conocidas localmente como manzanilla (*Matricaria recutita* L), hierba maestra (*Artemisia absinthium*), escobilla (*Haplopappus venetus*), estafiate (*Artemisia* sp), árnica (*Arnica montana* L), cempazuchitl (*Tagetes erecta*), santa maría (*Tanacetum parthenium*) y asomiate (*Senecio salignus*). La familia Lamiaceae por 4 especies; hierba buena (*Mentha piperita*), romero (*Rosmarinus officinalis*), mirto (*Salvia microphylla*) y orégano (*Origanum vulgare*). La familia Rutaceae estuvo representada por 4 especies; ruda (*Ruta graveolens*) naranja; (*Citrus x sinensis*) limón (*Citrus x limón*) y lima (*Citrus x aurantifolia*). Las familias restantes están representadas por dos o una sola especie (Tabla 1). Las plantas utilizadas con mayor frecuencia fueron: manzanilla (*Matricaria recutita* L) hierba buena (*Mentha x piperita*) ruda (*Ruta graveolens*) hierba maestra (*Artemisia Absinthium* L) epazote (*Dysphania ambrosioides*) y sábila (*Aloe barbadensis*). De acuerdo con las

entrevistas, a estas especies se les atribuyen propiedades curativas para el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades del sistema, así como analgésico, desinflamante y dolor. Los padecimientos para los que se utiliza el mayor número de especies son para enfermedades del sistema digestivo como dolor de estómago, desparasitante, diarrea, cólicos (Tabla N° 2).

La frecuencia de uso más alta correspondió a la manzanilla (*Matricaria recutita*) seguida de las especies *Mentha x piperita* y *Ruta graveolens*, con valores de 11.6, 10.7 y 8.9 respectivamente (Tabla N° 1). En cuanto al valor de uso de las especies medicinales, la manzanilla y la hierba buena tuvieron los índices más altos y los más bajos lo compartieron 4 especies con valor de uso de 0.01. Asimismo, del total de especies reportadas el 27.9% son endémicas (Tabla N° 3). Los tipos biológicos de las especies que componen la herbolaria medicinal, 58.1% fueron herbáceas, 20.9%, arbóreas y arbustivas. Referente a la ubicación de las especies curativas, 65% de ellas se encuentran en huertos familiares, seguido de los acahuals 19% (zona de transición entre la selva y los terrenos agrícolas donde la vegetación surge de

manera espontánea) y potreros 16%. Las partes más utilizadas de las plantas son las hojas (55%) las flores (25%), frutos (12%) corteza y tallo (8%). Las comunidades que mostraron mayor conocimiento basádonos en la frecuencia del uso de plantas fue San Miguel Eloxochitlan (41.5%) seguido de

Zacacoapa (19.5%) Mirador (13.2%) Macuiltepec (10%) Macuicoutitla (5.8%) y Atexacapa (3.8%). En cuanto a la forma de preparación utilizan la técnica de maceración (30.2%), cocimiento (28.3%), infusión (26%) y tintura (15.5%).

Tabla N° 1
Familias, nombres científicos, comunes, parte utilizada y formas biológicas de plantas medicinales utilizadas en la Sierra Negra de Puebla, México

Familia	Especie	Nombre común	Parte vegetal	Forma de vida	Frecuencia de Uso	Valor de Uso
Asteraceae	<i>Matricaria recutita L.</i>	Manzanilla	HJ,FL	Herbácea	11,65	1,00
Lamiaceae	<i>Mentha x piperita</i>	Hierba buena	HJ	Herbácea	10,71	0,92
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i>	Ruda	HJ	Herbácea	8,98	0,77
Asteraceae	<i>Artemisia absinthium l</i>	Hierba maestra	HJ	Herbácea	8,82	0,76
Amaranthaceae	<i>Dysphania ambrosioides</i>	Epazote	HJ	Herbácea	5,35	0,46
Asteraceae	<i>Haplopappus venetus</i>	Escobilla	HJ, T	Herbácea	5,20	0,45
Xanthorrhoeaceae	<i>Aloe barbadensis</i>	Sábila	HJ	Herbácea	5,20	0,45
Asteraceae	<i>Artemisia sp.</i>	Estafiate	HJ	Herbácea	4,88	0,42
Asteraceae	<i>Artemisia sp.</i>	Tapón	HJ	Herbácea	4,88	0,42
Asteraceae	<i>Arnica montana L.</i>	Árnica	HJ	Árbol	3,31	0,28
N.I		Totonikxiutil	HJ,FR	Herbácea	4,57	0,39
Primulaceae	<i>Primula vulgaris</i>	San pablito	HJ	Herbácea	3,15	0,27
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	HJ	Herbácea	2,68	0,23
Betulaceae	<i>Alnus acuminata</i>	Elite	HJ	Arbusto	1,73	0,15
Lauraceae	<i>Cinnamomum verum</i>	Canela		Arbusto	1,73	0,15
Pinaceae	<i>Pinus ayacahuite</i>	Acahuite	HJ,C	Herbácea	1,73	0,15
Lamiaceae	<i>Salvia microphylla</i>	Mirto	HJ	Herbácea	1,42	0,12
Rubiaceae	<i>Hamelia patens Jacq</i>	Hierba santa Cimarron	HJ	Herbácea	1,26	0,11
Apiaceae	<i>Aptium graveolens</i>	Apio		Arbusto	1,10	0,09
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Hojas de guayaba	HJ	Árbol	0,94	0,08
Rosaceae	<i>Prunus pérsica</i>	Durazno	HJ, C,FR	Árbol	0,94	0,08
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	HJ	Herbácea	0,79	0,07
Tiliaceae	<i>Tilia europea</i>	Flor de tila	HJ	Herbácea	0,79	0,07
Adoxaceae	<i>Sambucus mexicana</i>	Sauco	HJ	Herbácea	0,63	0,05
Asteraceae	<i>Tagetes erecta</i>	Cempazuchitl	HJ,FL	Arbusto	0,63	0,05
Pinaceae	<i>Cedrus sp</i>	Cedro	HJ,C	Arbusto	0,63	0,05
Rutaceae	<i>Citrus X sinensis</i>	Hojas de naranjo	HJ,FR	Arbusto	0,63	0,05
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	HJ	Árbol	0,63	0,05

Amaryllidaceae	<i>Allium sativum</i>	Ajo	Bulbo	Árbol	0,47	0,04
Asparagaceae	<i>Yucca sp</i>	Izote		Arbusto	0,47	0,04
Asteraceae	<i>Tanacetum parthenium</i>	Santa María	HJ	Arbusto	0,47	0,04
Cactaceae	<i>Opuntia sp</i>	Nopal		Árbol	0,47	0,04
Euphorbiaceae	<i>Ricinus comunis</i>	Higuerilla	HJ,FR	Herbácea	0,47	0,04
Rutaceae	<i>Citrus x limón</i>	Limón	FR	Herbácea	0,47	0,04
Asteraceae	<i>Senecio salignus</i>	Azomite	HJ	Herbácea	0,31	0,03
Fabaceae	<i>Erythrina americana</i>	Equimite	HJ	Árbol	0,31	0,03
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	Eucalipto	HJ	Herbácea	0,31	0,03
Rutaceae	<i>Citrus x aurantiifolia</i>	Flor de lima	HJ,FL	Herbácea	0,31	0,03
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jitomate		Arbusto	0,31	0,03
Apiaceae	<i>Cuminum cyminum</i>	Comino		Herbácea	0,16	0,01
Asparagaceae	<i>Sansevieria trifasciata</i>	Lengua de vaca	HJ	Herbácea	0,16	0,01
N.I		Ospaxul	HJ	Árbol	0,16	0,01
Rosaceae	<i>Prunus salicifolia</i>	Hoja de capulin	HJ,FR	Árbol	0,16	0,01

Partes vegetales: HJ: hojas, FL: flor, FR: fruto, C: corteza. T: tallo.

*N.I: especie no identificada.

Tabla N° 2
Resultados de las frecuencia de uso de plantas medicinales por enfermedades en la Sierra Negra de Puebla

Aparatos o sistemas	Enfermedades	Especies utilizadas	N° de especies utilizadas por enfermedad	
Digestivo	Bilis	Hierba maestra (<i>Artemisia absinthium</i>)	1	
		Gastritis	Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)	3
		Hojas de guayaba (<i>Psidium guajava</i>)		
		Hierba maestra (<i>Artemisia absinthium</i>)		
	Higado	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	1	
	Infección/Dolor estomacal		Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>)	9
			Hierba santa cimarron (<i>Hamelia patens</i>)	
			Flor de Tila (<i>Tilia europea</i>)	
			Cempazuchitl (<i>Tagetes erecta</i>)	
			Escobilla (<i>Haplopappus venetus</i>)	
Santa María (<i>Tanacetum parthenium</i>)				
Epazote (<i>Dysphania ambrosioides</i>)				
Hierba buena (<i>Mentha x piperita</i>)				
Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)				
Empacho				Hierba buena (<i>Mentha x piperita</i>)
	Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)			
	Oregano (<i>Origanum vulgare L</i>)			
	Mirto (<i>Salvia microphylla</i>)			
Desparasitante		Lengua de vaca (<i>Sansevieria trifasciata</i>)		
		Elite (<i>Alnus acuminata</i>)	6	

		Hojas de naranjo (<i>Citrus X sinensis</i>)	
		Hierba maestra (<i>Artemisia absinthum</i>)	
		Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	
		Durazno (<i>Prunus pérsica</i>)	
		Epazote (<i>Dysphania ambrosioides</i>)	
Circulatorio	Hemorragias	Escobilla (<i>Haplopappus venetus</i>)	1
Excretor	Riñón	Arnica (<i>Arnica montana</i>)	1
Respiratorio	Tos-gripa	Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>)	5
		Oregano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	
		Hierba buena (<i>Mentha x piperita</i>)	
		Cempazuchitl (<i>Tagetes erecta</i>)	
		Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)	
Endocrino	Diabetes	Higuerilla (<i>Ricinus communis</i>)	1
Nervioso	Nervios	Flor de Tila (<i>Tilia europea</i>)	1
Otros	Irritaciones de la piel	Estafiate (<i>Artemisia ludoviciana</i>)	4
		Santa María (<i>Tanacetum parthenium</i>)	
		Mirto (<i>Salvia microphylla</i>)	
		Sauco (<i>Sambucus mexicana</i>)	
	Golpes	Cedro (<i>Cedrus sp.</i>)	1
	Quemaduras	Sauco (<i>Sambucus mexicana</i>)	2
		Sabila (<i>Aloe barbadensis</i>)	
	Mal aire-limpias	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	6
		Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	
		Azomite (<i>Senecio salignus</i>)	
		San pablito (<i>Primula vulgaris</i>)	
		Santa María (<i>Tanacetum parthenium</i>)	
		Apio (<i>Apium graveolens</i>)	
	Susto	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	1
	Desinflamatorio/Dolor	Cedro (<i>Cedrus sp.</i>)	10
		Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	
		Elite (<i>Alnus acuminata</i>)	
		Comino (<i>Cuminum cyminum</i>)	
		Equmite (<i>Erythrina americana</i>)	
		Acahuite (<i>Pinus ayacahuite</i>)	
		Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	
		Azomite (<i>Senecio salignus</i>)	
		Apio (<i>Apium graveolens</i>)	
		Sauco (<i>Sambucus mexicana</i>)	
	Baños postparto	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	2
		Mirto (<i>Salvia microphylla</i>)	
	Cólicos	Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)	3
		Escobilla (<i>Haplopappus venetus</i>)	
		Hierba santa cimarrón (<i>Hamelia patens</i>)	

Tabla N° 3
Origen y forma biológica de las plantas utilizadas en la Sierra Negra de Puebla, México

	Árbol	Arbusto	Herbácea
Endémica	3	3	6
Introducida	6	6	19

DISCUSIÓN

El uso de plantas medicinales en las regiones de América Latina representa un valor importante para cada país. En estudios etnobotánicos relacionados con el uso de plantas medicinales, las percepciones de las personas nativas sobre el uso de éstas y la diversidad de plantas que utilizan es amplia. De acuerdo con Arango (2004) y Arias-Toledo *et al.* (2007) el “conocimiento empírico” no es homogéneo respecto a su aplicación y hay una gran diversidad sobre éste y sobre el número de especies de cada población. En el uso de plantas medicinales la región juega un papel muy importante, a diferencia de la globalización en la medicina, la percepción de la población en uso de las plantas medicinales varía de una cultura a otra. Incluso entre géneros, es notorio y de destacar que el mayor conocimiento lo poseen las mujeres (Hanazaki *et al.*, 2000; Vázquez *et al.*, 2011). La mujer como ama de casa y encargada del hogar juega un papel muy importante dentro de estas comunidades. Además de las labores domésticas, se encarga de aliviar las enfermedades de sus familiares (Arango, 2004), el conocimiento empírico del uso de remedios a base de plantas medicinales se transmite de mujer a mujer (madre a hija, suegra a nuera) lo que contribuye a un mayor conocimiento. En comunidades rurales como lo menciona Casas *et al.* (1994) se observa una división tradicional en la división del trabajo.

Del mismo modo de acuerdo con Arias-Toledo (2009), la edad también juega un papel importante en el conocimiento de los recursos naturales, asociándola a un mayor conocimiento por parte de las personas de mayor edad, esto coincide con lo reportado por Hernández *et al.* (2005) y Sánchez-González *et al.* (2008), y es transmitido de generación en generación, lo cual coincide con lo reportado por Valdés-Cobos (2013). Este último indica que en la Mixteca Alta de Oaxaca el conocimiento del uso de plantas se ha conservado por tradición y es generacional. Sin embargo, debido a los cambios en las condiciones de vida, el contexto histórico y económico de los jóvenes estos saberes se han ido perdiendo, principalmente por desinterés de

las nuevas generaciones. La pérdida del conocimiento entre generaciones es de gran preocupación si se considera que muchas poblaciones rurales hacen uso de las plantas medicinales para subsistir (Ladio y Lozada, 2008). En este estudio se encontró que un alto porcentaje de la población (85%) no asiste al médico, resuelven sus padecimientos con recetas de plantas medicinales, y sólo van al médico cuando la afectación es muy grave, o no la pueden controlar. De acuerdo con Valdés-Cobos (2013) las plantas medicinales constituyen una alternativa ante la carencia de servicios para atender la salud, es por ello que se debe reconocer su importancia y poner énfasis en la conservación de las plantas medicinales.

En este estudio se reportó el uso de 43 especies divididas en 9 familias, entre las que sobresalen Asteraceae y Lamiaceae, lo cual coincide parcialmente con los resultados reportados por Gómez-Álvarez (2012), y Magaña *et al.* (2010) quienes también reportaron un mayor uso medicinal dentro de la familia Asteraceae y Lamiaceae. La familia Asteraceae ocupa un lugar preponderante en la flora de México tanto a nivel de género como de especie y contribuye a la enorme riqueza del país (Villaseñor, 2004; Canales *et al.*, 2005; Gómez-Álvarez, 2012).

Respecto a las principales enfermedades que se tratan destacan las gastrointestinales; lo cual coincide con lo reportado por Hernández *et al.* (2005), quienes realizaron un estudio sobre las plantas medicinales utilizadas para aliviar enfermedades en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. En este sentido Orantes-García *et al.* (2018) enuncia que, las plantas también son utilizadas para uso dermatológico como: heridas, irritación, y granos, o problemas del sistema respiratorio: tos, gripe, dolor de garganta. También se reportan plantas para tratar lo que la población conoce como “el susto” y “el espanto” lo cual también ha sido reportado en otros trabajos (Sánchez-González *et al.*, 2008; Argueta 2012).

Del total de especies reportadas (43) son especies de uso medicinal tradicional y su uso ha sido validado con estudios científicos tal es el caso del

campazuchil (*Tagetes erecta*) árnica (*Heterotheca inuloides*) manzanilla (*Matricaria recutita*) mirto (*Salvia microphylla*) entre otras (López et al., 2001; Hernández et al., 2006; Nogueira et al., 2008; Vikas et al., 2010; Mathur et al., 2011; Rodríguez-Chávez, 2015). En cuanto a la forma biológica las que predominan son las herbáceas (58.1%) seguidas de las arbóreas y arbustivas. Esto también se ha reportado en el trabajo realizado por Magaña et al. (2010) y Zambrano et al. (2015) donde indican que la mayoría de plantas medicinales son hierbas y en menor porcentaje árboles y arbustos, principalmente por el tamaño que tienen ya que ocupan menos espacio dentro de sus huertos, además de que su obtención y manejo es más fácil. Lo cual coincide con este estudio ya que la mayoría (65%) de las personas obtiene las plantas de sus huertos.

Los valores encontrados en cuanto al valor de uso (VUis) y frecuencia de uso indican que las especies más utilizadas tienen un alto valor de uso lo cual se relaciona con el número total de usos reportados, en este estudio destacan las especies *Matricaria recutita*, *Mentha x piperita* y *Ruta graveolens*. A este respecto es importante indicar que del total de especies reportadas en este estudio el 27.9% son endémicas de México; *Dysphania ambrosioides*, *Happlopis venetus* *Alnus acuminata*, *Pinus ayacahuite*, *Salvia macrophylla*, *Psidium guajava*, *Sambucus mexicana*, *Tagetes erecta*, *Senecio salignus*, *Erythrina americana*, *Solanum lycopersicum* y *Prunus salicifolia*. Las especies restantes pese a no ser endémicas fueron introducidas hace siglos y han sido naturalizadas en México con gran éxito para tratar distintas afecciones, principalmente en comunidades indígenas como el cempazuchil (*Tagetes erecta*) y el epazote (*Dysphania ambrosioides* (Leonti et al., 2003).

CONCLUSIONES

De las personas entrevistadas, 79.5% fueron mujeres, lo cual denota el rol y preponderancia que tiene la mujer en el conocimiento sobre las plantas medicinales y sus usos en la medicina tradicional. Los rangos de edades de los entrevistados indican que existe una tendencia a la apropiación del conocimiento por parte de adultos, del sexo femenino y en menor medida por parte de jóvenes. En el estudio realizado se reportaron 43 especies de plantas de uso medicinal pertenecientes a 21 familias botánicas. Las familias mejor representadas fueron Asteraceae, Lamiaceae y Rutaceae, el resto de las

familias estuvieron representadas por dos y una especie. La especie *Matricaria recutita* fue la más utilizada. En cuanto a la obtención, la mayoría de las personas indicó que obtienen las plantas de la propia comunidad, incluso un importante porcentaje de los encuestados (65%) cultiva las plantas en huertos. Los índices valor de uso y frecuencia de uso reflejan la realidad circundante del conocimiento local que posee la población rural en cuanto a la biodiversidad de especies de plantas con algún uso medicinal. Asimismo, algunas de las especies reportadas en este estudio son endémicas de México, y otras han sido introducidas con gran éxito para curar distintos malestares, por tanto se debe reconocer la importante herencia cultural que tiene México en el uso de plantas medicinales.

REFERENCIAS

- Annan K, Houghton PJ. 2007. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. **J Ethnopharmacol** 119: 141 - 144.
- Arango S. 2004. Estudios etnobotánicos en los Andes centrales (Colombia): distribución del conocimiento del uso de plantas según características de los informantes. **Lyonia** 7: 89 - 104.
- Argueta A, Zolla C, Mata S. 2012. **La medicina tradicional indígena de México: el largo camino para su legalización y reconocimiento**. en Argueta A, Gómez M, Navia J. Eds., Conocimiento tradicional, innovación y reapropiación social. Siglo XXI-UNAM, México.
- Arias-Toledo B, Colantonio SE, Galetto L. 2007. Knowledge and use of food and medicinal plants in two populations from the Chaco, Córdoba province, Argentine. **J Ethnobiol** 27: 218 - 232.
- Arias-Toledo B. 2009. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 8: 389 - 401
- Barragán SA. 2006. La práctica de la autoatención por fitoterapia en un grupo de familias mexicanas. **Arch Med Fam** 8: 155 - 162.
- Bravo M, Arteaga MI, Herrera FF. 2017. Bioinventario de especies subutilizadas

- comestibles y medicinales en el norte de Venezuela. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 15: 347 - 360.
- Bullain-Galardis M, Viera-Tamayo M, Avilés-Tamayo Y. 2015. Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones hexánica, diclorometánica, clorofórmica y etanólica de las hojas de *Farama occidentalis* (L.) A. Rich. **Química Viva** 14: 71 - 80.
- Caballero J, Cortés L. 2001. **Percepción uso y manejo tradicional de los recursos vegetales en México**. En Plantas cultura y sociedad. Rendón B, Rebollar S, Caballero J, Martínez MA Eds. Universidad Autónoma Metropolitana-SEMARNAP, México DF, México.
- Caceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of Gastrointestinal disorders. **J Ethnopharmacol** 30: 55 - 73.
- Canales M, Hernández T, Caballero J, Romo de Vivar A, Ávila G, Duran A, Lira R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. **J Ethnopharmacol** 97: 429 - 439.
- Casas A, Viveros JL, Caballero J. 1994. **Etnobotánica mixteca. Sociedad, cultura y recursos naturales en la montaña de Guerrero**. Instituto Nacional Indigenista. México DF, México.
- Casas A, Valiente-Banuet A, Viveros JL, Dávila P, Lira R, Caballero J, Cortés L, Rodríguez I. 2001. Plant resources of the Tehuacán Valley, México. **Econ Bot** 55: 129 - 166.
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. 2008. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **J Ethnopharmacol** 122: 402 - 405.
- CONAPO. 2010. **Índice de marginación por entidad federativa y municipio 2010**. Consejo Nacional de Población. México.
- Cruz-García RA. 2007. **Plantas medicinales de nueve comunidades en la frontera entre Chignahuapan, Ixtacamaxitlán y Aquixtla, Puebla**. Tesis, Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, México.
- Dávila P, Arizmendi M, Valiente-Banuet A, Casas A, Villaseñor JL, Lira R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. **Biodiv Conserv** 11: 421 - 442.
- Gómez-Alvarez R. 2012. Medicinal plants in a small village in the state of Tabasco México. **Revista Fitotecnia Mexicana** 35: 43 - 49.
- Hanazaki N, Tamashiro J, Leitão-Filho H, Begossi A. 2000. Diversity of plant uses in two Caçara communities from the Atlantic Forest coast, Brazil. **Biodiv Conserv** 9: 597 - 615.
- Hernández T, Canales M, Caballero J, Durán A, Lira R. 2005. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. **Interciencia** 30: 17 - 27.
- Hernández T, Canales M, Flores C, García AM, Durán A, Avila JG. 2006. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. **Pharmaceut Biol** 44: 19 - 22.
- INEGI. 2010. **Datos básicos de la geografía de México**. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. [Http://www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx)
- Kakuko Y, Fumiko A, Ariaki N, Hikaru O, Lozada L, López E, Estrada E, Aguilar A, Reyes R. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. **J Ethnopharmacol** 97: 293 - 299.
- Ladio HA, Lozada M. 2008. Human ecology, ethnobotany and traditional practices in rural populations inhabiting the Monte region: Resilience and ecological knowledge. **J Arid Environm** 73: 222 - 227.
- Leonti M, Sticher O, Heinrich M. 2003. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (México). **J Ethnopharmacol** 88: 119 - 124.
- Linares E, Flares P, Bye R. 1999. **Selección de plantas medicinales de México**. Ed. Limusa, Mexico DF, México.
- Lopez A, Hudson JB, Towers GHN. 2001. Antiviral and microbial activities of Colombian medicinal plants. **J Ethnopharmacol** 77: 189 - 196.
- Magaña MA, Gama LMC, Mariaca MR. 2010. El uso de las plantas medicinales en las comunidades maya-chontales de Nacajuca, Tabasco, México. **Polibotánica** 29: 213 - 262.
- Martínez-Moreno D, Alvarado-Flores R, Mendoza-

- Cruz M, Basurto-Peña F. 2006. Plantas medicinales de cuatro mercados del Estado de Puebla, México. **Bol Soc Bot Mex** 79: 79 - 87.
- Mathur A, Verma SK, Yousuf S, Singh SK, Prasad G, Dua VK. 2011. Antimicrobial potential of roots of *Ricinus communis* against pathogenic microorganisms. **Int J Pharma Bio Sci** 2: 545 - 555.
- Miranda-Cruz E, Espinosa-Moreno J, Centurión-Hidalgo D, Velázquez-Martínez JR, Alor-Chávez MJ. 2012. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 11: 354 - 361.
- Monroy C, Castillo P. 2007. **Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos**. Ed Universidad Autónoma de Morelos, México.
- Niño J, Narváez DM, Mosquera OM, Correa YM. 2006. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. **Braz J Microbiol** 37: 566 - 570.
- Nogueira JC, Diniz MF, Lima EO. 2008. *In vitro* antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. **Braz J Otorhinolaryngol** 74: 118 - 124.
- Orantes-García C, Moreno-Moreno RA, Caballero-Roque A, Farrera-Sarmiento O. 2018. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de comunidades campesinas e indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 17: 503 - 521.
- Paredes-Flores M, Lira-Saade R, Davila-Aranda PD. 2007. Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. **Acta Bot Mex** 79: 13 - 61.
- Pirondo A, Coulleri JP, Keller HA, Ferrucci MS. 2011. Influencia de factores externos sobre la comercialización de plantas medicinales en un medio urbano: El caso de vendedores criollos e indígenas en Corrientes, Argentina. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 553 - 569.
- Rangel D, García I, Velasco J, Buitrago D. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. **Rev Fac Farm** 42: 43 - 46.
- Rodríguez-Chávez JL, Rufino-González Y, Ponce-Macotela M, Delgado G. 2015. *In vitro* activity of "Mexican Arnica" heterotheca inuloides Cass natural products and some derivatives against Giardia intestinalis. **Parasitology** 142: 576 - 584.
- Sánchez-González A, Granados-Sánchez D, Simón-Nabor R. 2008. Plant medicinal use by otomies of Nicolas Flores municipality, Hidalgo, Mexico. **Rev Chapingo - Serie Horticultura** 14: 271 - 279.
- SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social). 2012. **Medición de la pobreza, variantes metodológicas y estimación preliminar**. Comité Técnico para la Medición de la Pobreza. Serie documentos de investigación, México.
- Sotero-García AI, Arteaga-Reyes T, Campos-Martínez R, Bunge-Vivier V. 2018. Conocimiento local del género *Arcyuthobium* en un Área Natural Protegida del centro de México. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 17: 120 - 129.
- Toscano GY. 2006. Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda San Isidro, Municipio de San José de Pare-Boyacá: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. **Acta Biol Colomb** 11: 137 - 146.
- Valdés-Cobos A. 2013. Conservación y uso de plantas medicinales: el caso de la región de la Mixteca Alta Oaxaqueña, México. **Ambiente y Desarrollo** 17: 87 - 97.
- Vázquez MB, Martínez-Corona B, Aliphat-Fernández M, Aguilar-Contreras A. 2011. Uso y conocimiento de plantas medicinales por hombres y mujeres en dos localidades indígenas en Coyomeapan, Puebla, México. **Interciencia** 36: 493 - 499.
- Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE, Gordillo-Martínez AJ. 2010. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. **Polibotánica** 30: 193 - 238.
- Villaseñor J. 2004. **Los géneros de plantas vasculares de la flora de México**. **Bol Soc Bot Mex** 75: 105 - 135.
- Vikas G, Payal M, Parveen B, Khokra SL, Dhirender K. 2010. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*. A Review. **Int J**

ANEXOS

2DO ARTICULO ENVIADO

ARTÍCULO II. IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANTS USED IN MEXICAN TRADICIONAL MEDICINE ON FOODBORNE BACTERIA

Del estudio de la información obtenida de este apartado, se realizó un artículo científico que fue enviado a la Revista *Pharmaceutical Biology* la cual se encuentra indexada en Academic Search Complete; BIOBASE; Biochemistry and Biophysics Citation Index; Biological Abstracts; BIOSIS Previews; Biotechnology Abstracts; Chemical Abstracts; Consumer Health Complete; Derwent Drug File; Derwent Chimera; DOAJ; EMBASE; EMBIOLOGY; ETOH; International Pharmaceutical Abstracts; Microbiology Abstracts; PopLine; SciSearch; SCOPUS; Zoological Record CABI Global Health; Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; AgBiotech News and Information; AgBiotechNet; Agricultural Economics Database; Agroforestry Abstracts; Animal Breeding Abstracts; Animal Production Database; Animal Science Database; Biocontrol News and Information; Botanical Pesticides; Crop Physiology Abstracts; Crop Science Database; Dairy Science Abstracts; Environmental Science Database; Field Crop Abstracts; Forest Products Abstracts; Forest Science Database; Forestry Abstracts; Grasslands and Forage Abstracts; Helminthological Abstracts; Horticultural Science Abstracts; Horticultural Science Database; Index Veterinarius; Nutrition Abstracts and Reviews Series A; Nutrition and Food Sciences Database; Nutrition CD; Organic Research Database; Ornamental Horticulture; Parasitology Database; Pig News and Information; Plant Breeding Abstracts; Plant Genetic Resources Abstracts; Plant Genetics and Breeding Database; Plant Growth Regulator Abstracts; Plant Protection Database; Postharvest News and Information; Poultry Abstracts; Protozoological Abstracts; Review of Agricultural Entomology; Review of Aromatic and Medicinal Plants; Review of Medical and Veterinary Entomology; Review of Medical and Veterinary Mycology; Review of Plant Pathology; Rural Development Abstracts; Seed Abstracts; Soil Science Database; Soils and Fertilizers; Soybean Abstracts; Sugar Industry Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; Veterinary Bulletin; Veterinary Science Database; Weed Abstracts; World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstracts; PubMed/Medline.

1
2
3 ***In vitro* and *in vivo* evaluation of antimicrobial activity of plants used in**
4
5
6 **Mexican traditional medicine on foodborne bacteria**
7
8
9

10
11 Guadalupe Velázquez-Vázquez¹, Beatriz Pérez-Armendáriz^{1*}, Verónica Rodríguez
12
13 Soria¹
14
15

16 ¹*Decanato de Ciencias Biológicas. Facultad de Biotecnología. Universidad Popular Autónoma*
17
18 *del Estado de Puebla, 21 sur 1103 Col. Santiago, 72160. Puebla, México.*
19
20

21
22
23 *Corresponding author: beatriz.perez@upaep.mx
24

25 Guadalupe Velázquez-Vázquez: ORCID 0000-0001-9879-0968
26

27 Beatriz Pérez Armendáriz: ORCID 0000-0002-4956-2480
28

29 Verónica Rodríguez Soria: ORCID 0000-0002-2287-8338
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

***In vitro* and *in vivo* evaluation of antimicrobial activity of plants used in Mexican traditional medicine on foodborne bacteria**

Abstract

Context: This work evaluates extracts from plants used in indigenous communities of the Sierra Negra in Puebla, Mexico.

Aim of the study: To evaluate four plant extracts against pathogenic bacteria present in foods through *in vitro* and *in vivo* tests, to create a proposal for a natural antiseptic in post-harvest vegetables.

Materials and methods: Phytochemical screening was performed on extracts from *Ricinus communis*, *Bidens alba*, *Sambucus canadensis* and *Salvia microphylla*. The extracts were analyzed and purified by chromatographic methods and structural identification was determined by FTIR spectroscopy. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined for *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* and *S. aureus* bacteria. Tests with *Lycopersicon esculentum* were carried out *in vivo* to evaluate bacterial load according to the maximum permissible limit (MPL).

Results: Extracts characterized by FTIR-ATR spectroscopy presented an intense absorption signal at different vibrational frequencies (cm^{-1}) that correspond to chemical structures with the carbonyl group present in some secondary metabolites. The chromatography, phytochemical screening and FTIR spectrum enabled us to confirm the presence of saponins, ketones, and alkaloids with antimicrobial activity. The 4 extracts presented MIC from 125 $\mu\text{g/mL}$ to 500 $\mu\text{g/mL}$ in the evaluated bacteria. In the *in vivo* tests with *Lycopersicon esculentum*, the 4 extracts showed a decrease in *E. faecalis* bacteria below the MPL.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Key words: *Bidens alba*, natural antimicrobials, plant extracts, post-harvest control, *Ricinus communis*, *Salvia microphylla*, *Sambucus canadensis*.

Introduction.

In recent years, concern about the microbiological innocuity of fruits and vegetables has increased (Marriot et al. 2018; Todd et al. 2010) particularly due to the huge issue that foodborne diseases (FBD) represent for human health and the consequential social and economic repercussions (Kopper et al. 2009; SENASICA 2011; Yu et al. 2018). Food contamination can be endogenous or occur at some point during its transformation (cultivation, harvest, distribution, preparation) whether by human or other etiological agent that may be present in animals, vegetables or the environment (Greig et al. 2007; Islam et al. 2004; OMS 2017).

Every year, an estimated 600 million people (1 of every 10 inhabitants) fall sick from eating contaminated food and 420,000 die as a result (WHO 2015). Just as morbidity and mortality figures are on the rise due to the multiple resistance that bacteria have developed to any disinfectant and/or antibiotic (Joray et al. 2013; O'Neill 2016), so too is the consumption of fruits and vegetables, the result of higher demand for minimally processed or healthier products (Batz et al. 2011; Beuchat 2002; Mandrell 2009).

The alternatives to reduce microbiological contamination and avoid risk to human health are based mainly on the use of chemical substances such as disinfectants and synthetic preservatives, which may have carcinogenic and teratogenic effects due to their residual toxicity (Juneja et al. 2012; Miché and Balandreau 2001). Today, one of the alternatives to control the proliferation of

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

from plants) as a potential substitute for synthetic antimicrobials, thus avoiding problems of resistance to microorganisms due to the overuse of chemical synthesis products (Akiyama et al. 2001; Baris et al. 2006; Miranda-Cruz et al. 2012).

The extracts from many plant species have been shown to have activity against some microorganisms associated with foodborne diseases, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, among others (Abdallah 2016; Burt 2004; Navarro et al. 2006).

However, little emphasis has been placed on evaluating plants that have been used for centuries in traditional medicine (Khan et al. 2019; Ullah et al. 2014; Waizel-Bucay and Waizel-Haiat, 2009), above all, plant species widely used in the indigenous communities of the Sierra Negra in Puebla, Mexico (Velázquez-Vázquez et al. 2019). Such plants include *Ricinus communis*, used mainly as a laxative, antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial primarily for its phytochemical constituents, such as flavonoids, saponins, glycosides and alkaloids (Jena et al. 2012; Mann et al. 2013; Ribeiro et al. 2016). *Sambucus canadensis* is recognized for having medicinal, antiviral properties associated with triterpenes, glycosides, phenols, flavonoids, tannins and coumarins (Lee and Finn 2007; Ulbricht et al. 2014). *Salvia microphylla* has an antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic effect and is considered a promising source of natural genoprotectors (Azqueta et al. 2010; Fazly-Bazzaz et al. 2002; Knezevic-Vukcevic et al. 2005). *Bidens alba* has antiseptic, anti-inflammatory functions for gastrointestinal disorders and the treatment of injuries, hypertension, jaundice and diabetes (Lans, 2006) mainly for its active ingredients: flavonoids, triterpenes and fatty acids (Ong et al. 2008). Due to the importance of using natural alternatives to fight pathogenic bacteria and reduce the damage they can cause to human health, it is relevant to

1
2
3 deepen our knowledge of Mexican flora and their potential contribution to ethnopharmacology.
4
5 The aim of this study was to evaluate the effect of four plant extracts against pathogenic bacteria
6 present in food through *in vitro* and *in vivo* testing, 1) to create a proposal for a natural antiseptic
7 in post-harvest vegetables to reduce the microbial load and produce innocuous foods of natural
8 origin, and 2) to identify the bioactive molecules present in these plants and their relationship with
9 the antimicrobial effect.
10
11
12
13
14
15

16 **Material and Methods**

17 ***Vegetable material***

18
19 The species selected for this study are used in traditional Mexican medicine, particularly in the
20 indigenous communities of the Sierra Negra in Puebla, for the treatment of a variety of ailments.
21
22 The information on the medicinal use of these plants was obtained by interview and personal
23 contact with traditional healers and people within the communities. The botanical names,
24
25
26
27
28
29
30
31
32 traditional use and plant parts used are shown in Table 1.

33 ***Preparation of extracts***

34
35 We collected 500 g of the plant species; *Sambucus canadensis*, *Salvia microphylla*, *Ricinus*
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

We collected 500 g of the plant species; *Sambucus canadensis*, *Salvia microphylla*, *Ricinus communis* and *Bidens alba*. The plant samples were collected and subsequently identified in the Jardín Botánico of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; a sample of each plant is kept in the herbarium of the botanical garden. The plants were dried in the shade and the dried leaves were macerated in a 4L Erlenmeyer flask of 96% ethanol with double filtration. The extracts were vacuum filtered with Whatman No. 4 paper and the filtrate concentrated on a Büchi brand rotary evaporator under reduced pressure at $35 \pm 15^\circ \text{C}$. The ethanolic extracts were evaporated in a vacuum hood until completely dry. The yield of the plant extracts was obtained using the formula

2
3 Where:

4 PE: Weight obtained after extraction

5
6 PI: Initial weight of plant material on extraction

7
8
9 ***Chemical profile of extracts***

10
11 Standard tests with slight modifications were performed to obtain the qualitative identification of
12 the different metabolite groups (Gamboa et al. 2018; Patil et al. 2014), coumarins (Baljet),
13 triterpenes and steroids (Liebermann-Burchard), saponins (foam and Rosenthaler), tannins (gelatin
14 and ferric chloride), cyanogenic glycosides (Grignard), flavonoids (Shinoda, Pew's, NaOH),
15 alkaloids (Dragendorff, Mayer and Wagner). Each test was performed in triplicate. Thin layer
16 chromatography (TLC) was used using Merck HF254 silica gel chromatoplates 0.3 mm thick; using
17 hexane-ethyl acetate (AcOEt) as mobile phase (5:1). The plates were observed under UV Lamp,
18 P/N 95-0279-0, at wavelengths of 254 and 365 nm to observe the number of fluorescent
19 compounds. Subsequently, a developing agent based on molybdate pentahydrate was used for the
20 compounds that do not absorb ultraviolet light. The spectra were obtained by Fourier transformed
21 infrared spectroscopy (FTIR) on a Bruker brand infrared spectrophotometer in the range 4000-600
22 cm^{-1} .

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38 ***Microbiological analysis***

39
40 ***In vitro tests***

41
42 The 96-well microplate technique was used for the antimicrobial activity test. Each well was
43 deposited with an aliquot of 200 μL of culture medium, plus 20 μL of ethanolic extract at
44 concentrations of 125, 250 and 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of each plant species, plus 20 μL of pathogenic bacteria
45 inocula: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC19433), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) and
46 *E. coli* (ATCC 25922), belonging to the culture collection of the Biotechnology Department of the
47 Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla in Mexico, previously grown in nutritive
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using microplates at different dilutions. MIC values correspond to concentrations where the OD was equal to the initial inoculum after incubation for 24 h under standardized conditions (Yoon et al. 2014). MBC was determined using 100 µL from the wells in which no growth was observed in the OD reading and seeding onto Petri boxes with nutritive broth and incubating for 24 h at 37°C (Horna et al. 2005). Growth was determined qualitatively as (-) negative, (+) little, (++) medium and (+++) abundant.

In vivo tests

Tomatoes (*Solanum lycopersicum*) were used as the experimental unit, being one of the crops with most innocuity problems due to the presence of pathogenic microorganisms (Ocaña et al. 2015). Samples were collected from two local supermarkets in the state of Puebla. *S. aureus*, *E. faecalis*, *Kl. pneumoniae*, and *E. coli* bacteria were incubated in nutritive (Bioxon de México) for 24 h at 37°C. The four extracts, *Ricinus communis*, *Salvia microphylla*, *Sambucus canadensis* and *Bidens alba* were also used at a concentration of 500 mg/mL. Inoculation by immersion was reported as the most appropriate and common method for this kind of inoculation process (Beuchat et al. 2003; Tornuk et al. 2011) and was used to apply the different pathogenic bacteria to the tomatoes with OD between 0.4 and 0.5. Subsequently, the extracts were applied by the spray method (3ml) and again by the same method after 24 hours (Luna-Guevara et al. 2015; López et al. 2006). Three treatments were performed for each pathogenic bacterium (4) and each extract (4); T1 (tomato + bacteria); T2 (tomato + extract + bacteria); T3 (tomato with no bacteria and no extract), with three

1
2
3 repetitions for each one, giving a total of 54 experimental units. The microbiological innocuity
4
5 analyses were performed 24 hours after the previous procedure; the fruit was completely
6
7 homogenized in a previously sterilized blender. 1 mL of this mixture was taken and diluted in 9
8
9 mL of sterile peptone water to make different dilutions from 10^0 to 10^4 . The number of colony
10
11 forming units (CFU) was quantitatively evaluated. Subsequently, quality tests were carried out for
12
13 total mesophylls and Enterobacteriaceae (NOM-092-SSA1-1994).
14

15 16 17 **Statistical analysis**

18
19 An ANOVA was used to compare the effects of the concentrations of each bacterium per extract
20
21 and Tukey's *post hoc* test to find differences between treatments. An ANOVA was used to find the
22
23 effects and interactions between treatments, with the OD being the response variable. For the *in*
24
25 *vivo* tests, a one-way ANOVA was used, evaluating the CFU/ml growth for each extract, and
26
27 Dunnet's *post hoc* test to find differences between treatments. A value of $p > 0.05$ was considered
28
29 statistically significant. The analyses were conducted with the Minitab statistics program (licensed
30
31 to the UPAEP).
32
33

34 35 **Result and Discussion**

36 37 **Chemical profile of the extracts**

38
39 The yield of the plant extracts for *Ricinus communis* was 7.23%; *Salvia microphylla*, 6.42%; *Bidens*
40
41 *alba*, 7.18% and *Sambucus canadensis*, 6.11%. The results obtained from the phytochemical
42
43 screening are given in Table 2, where it can be seen that the extracts present mainly compound
44
45 groups (alkaloids, saponins, tannins, coumarins). These components confer different activities
46
47 against various microorganisms. Tannins present in the evaluated extracts can inhibit extracellular
48
49 microbial enzymes (Clapé and Castillo 2011; Martinez-Frances et al. 2017, Patil and Bhise 2015).
50
51 In this study saponins were among the main compounds found in the evaluated plants. According
52
53
54

5 and altering cell permeability, so that the cell lyses causing the bacterial membranes to rupture,
6 hence the use of saponins in soaps, antimicrobials and anticancer drugs. There are many reports of
7 saponins isolated from leaves, fruits, seeds and stems with antimicrobial activity (Khan et al. 2009,
8 Yadava et al. 2008).

9
10
11
12
13
14
15 Other components associated with antimicrobial activity are glycosides, terpenoids and alkaloids
16 whose primary function is to protect plants against environmental microorganisms (Rodriguez-
17 Saucedo 2011). Alkaloids have inhibitory effects on the growth of pathogenic microorganisms due
18 to their ability to interbreed with DNA, stop protein synthesis, induce apoptosis and inhibit
19 carbohydrate metabolism enzymes (Sepulveda et al. 2003; Suffrediniet al. 2002). Terpenoids have
20 the capacity to destabilize the integrity and permeability of the membrane; they are chemical
21 components with potential biological activity during the defense response of plants which produce
22 them (Eisenreich et al. 2001).

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 Under FTIR spectra, the *Ricinus communis* extract showed a C-H bond stretching signal at 2853-
34 2924 cm^{-1} and a C=O carbonyl group signal at 1733-1637 cm^{-1} . C-O signals were also observed at
35 1034 cm^{-1} in the alkaloids. The *Salvia microphylla* spectrum showed an O-H stretching signal at
36 3273-2870 cm^{-1} , and an intense C=O signal at 1602-1702 cm^{-1} and C-C signals at 1043-1173-1326
37 cm^{-1} characteristic of the carbonyl group present. Absorption for the ketone group gives rise to
38 multiple bands in the IR spectrum. Aliphatic ketones absorb in the 1230-1100 cm^{-1} range; in our
39 samples the signals at 1326 cm^{-1} and 1173 cm^{-1} were identified as extension-flexion vibration
40 modes corresponding to the ketone group with weak, narrow peaks (Dominguez-Pérez et al. 2019;
41 Ng et al. 2014). The *Sambucus canadensis* spectrum showed an O-H strain signal at 3359.01 and
42 a C-H stretching signal at 2924.69 cm^{-1} and C-H bond torque signal at 1401.71 cm^{-1} corresponding
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The use of a natural product to reduce bacterial load is important for reducing diseases caused by
4 food contaminated with highly important bacteria such as *S. aureus* and *E. coli* (Somchit et al.
5 2003; Sudhakar et al. 2006). The results of this study match those reported by Tiwari et al. (2009)
6
7 Tornuk et al. (2011); Serra et al. (2008), showing that plants can be used as antibacterials in the
8
9 food industry against both Gram negative and Gram positive bacteria. Similarly, in agreement with
10
11 Cos et al. (2006) and Kim and Fung (2004), plant extracts are an important source to discover new
12
13 antimicrobials because of the wide chemical diversity they present. It is important, therefore, to
14
15 encourage research on the use of plants as an effective alternative to attack bacteria that affect food
16
17 innocuity, particularly for a country like Mexico with its wealth of more than 1340 plants reported
18
19 to have antimicrobial properties (Tajkarimi et al. 2010). Nevertheless, some plants may have toxic
20
21 effects due to the properties they contain (Neira et al. 2018); it is therefore important to conduct
22
23 pharmacological and toxicology studies, thus having scientific bases that support the safety,
24
25 effectiveness and quality of the extract used. The results shown in this work suggest that the
26
27 extracts of the 4 plants used in traditional medicine in the indigenous communities of the Sierra
28
29 Negra are effective against foodborne bacteria.
30
31
32
33
34
35
36

37 **Conclusions**

38
39 This study showed that extracts from *Ricinus communis*, *Salvia microphylla*, *Sambucus*
40
41 *canadensis* and *Bidens alba*, plants used in traditional medicine, have antimicrobial effects
42
43 against pathogenic foodborne bacteria. This property is linked to the presence of alkaloids and
44
45 saponins found in this research. The *in vitro* and *in vivo* tests revealed that the extracts were
46
47 capable of inhibiting bacterial growth in all the bacteria evaluated by over 60%. Moreover, the *in*
48
49 *vivo* tests showed that at least 3 of the 4 extracts tested are capable of reducing the microbial load
50
51
52
53

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

indicated that the plant extracts evaluated in this study may be an alternative to fight foodborne bacteria.

Acknowledgments

The authors are grateful to Research department of Popular Autonomous University of the State of Puebla (UPAEP) and National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the economic support for this research.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- 3
4
5
6 Acevedo L, Mendoza C, Oyon R. (2001). Total and fecal coliforms, some enterobacteria *staphylococcus*
7 *sp* and mould in salads for hot dogs sold in Maracay, Venezuela. *Arch Latinoam Nutr* 51 366-
8 370.
9
10
11
12 Abdallah EM (2016). Medicinal plants as an alternative drug against methicillin resistant *S. aureus*. *Int*
13 *J Microbiol Allied Sci* 3: 35–42.
14
15
16
17 Akiyama H, Fuji K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins
18 against *S. aureus*. *J. Antimicrob Chemother.* 48: 487- 491. <https://doi.org/10.1093/jac/48.4.487>.
19
20
21
22 Azqueta A, Pereira-Wilson C, Collins AR. (2010). Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect
23 cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J Agric Food*
24 *Chem.* 58: 7465-7471. <https://doi.org/10.1021/jf100082p>
25
26
27
28 Batz MB, Hoffman S, Morris JG. (2011). Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with
29 the Greatest Burden on Public Health. Health. University of Florida, Emerging Pathogens
30 Institute, Gainesville. <http://hdl.handle.net/10244/1022>
31
32
33
34 Baris O, Gulluce M, Sahin F, Ozer H, Kilic H, Ozkan H, Sokmen M, Ozbe, T. (2006). Biological
35 activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea Biebersteinii* Afan (Asteraceae).
36 *Turkish Journal of Biol* 30: 65-73.
37
38
39
40
41 Beuchat LR. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw
42 fruits and vegetables. *Microbes Infect* 4:413-423. [https://doi.org/10.1016/S1286-](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01555-1)
43 [4579\(02\)01555-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01555-1)
44
45
46
47
48 Bhutta ZA, Das JK, Walker N, Rizvi A, Campbell H, Rudan I, Black RE. (2013). Interventions to address
49 deaths from childhood pneumonia and diarrhoea equitably: what works and at what cost? *The*
50 *Lancet* 381(9875), 1417–1429. doi:10.1016/s0140-6736(13)60648-0
51
52
53
54
55
56
57
58
59

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223-253.

Clapé LO, Castillo AA. (2011). Pharmaceutical-toxicological characterization of medicinal plant *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* (L). R. Bolli. *Rev Cubana Farm* 45: 586-596.

Cos P, Vlietinck AJ, Vanden BD, Maes L.(2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of concept'. *J of Ethnopharmacol* 106: 290-302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>

Cutter, CN. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *E.coli*O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *J Food Prot* 63: 601-607. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.5.601>

Domínguez-Pérez LA, Lagunes-Gálvez LM. Barajas-Fernández J, Olán-Acosta MA, García-Alamilla R, García-Alamilla P. (2019). Caracterización vibracional de grupos funcionales en granos de cacao durante el tostado usando espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. *Antversitaria* 29, e2172. doi. <http://doi.org/10.15174.au.2019.2172>

Díaz LN. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos *Rev Est Trans* 1: 32-55.

Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* 6: 78-84 [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01812-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01812-4)

Fazly-Bazzaz BS, Izadyar AR. (2002). Antimutagenic activity of different fractions of *Salvia leriifolia* extract. *Iran J Basic Med Sci* 4: 241-257.

Gutierrez J, Tellez N. (2018). Antimicrobial activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on microorganisms associated with periodontal disease. *Int J Microbiol* 1:1-9. doi: 10.1155/2018/4147383

Greig JD, Todd ECD, Bartleson CA, Michaels BS. (2007). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part I. Description of the problem, methods, and

- agents involved. *J Food Prot* 70: 1752–1761. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.7.1752>
- Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. (2004). Fate of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl Environ Microbiol* 70:2497–2502.
[doi: 10.1128/aem.70.4.2497-2502.2004](https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2497-2502.2004)
- Jena J, Gupta AK. (2012). *Ricinus communis* linn: a phytopharmacological review. *Int J Pharm Sci* 4: 22-29.
- Joray MB, González ML, Palacios SM, Carpinella MC. (2011). Antibacterial activity of the plant-derived compounds 23-methyl-6-O-desmethyllauricepyrone and (Z,Z)-5-(Trideca-4,7-dienyl)resorcinol and their synergy with antibiotics against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J Agric Food Chem* 59: 11534–11542.
- Juneja VK, Dwivedi HP, Yan X. (2012). Novel natural food antimicrobials. *Annu Rev Food Sci T*. 3: 381–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101241>
- Khan WM, Shah SZ, MS Khan, Akhtar N. (2019). Evaluation of indigenous knowledge of medicinal plants from Tall Dardyal Hills, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *J Herb Med* 10:3-14.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100314>
- Kim S, Ruengwilysup C, Fung Y. (2004). Antibacterial Effect of Water-Soluble Tea Extracts on Foodborne Pathogens in Laboratory Medium and in a Food Model. *J Food Prot* 11: 2608-2612.
- Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. FAO. 190 pp.
- Knezevic-Vukcevic J, Vukovic, Gacic B, Stevic T, Stanojevic J, Nikolic B, Simic D. (2005). Antimutagenic effect of essential oil of eano (*Salvia officinalis*) and its fractions against UV.

**3ER ARTICULO
ACEPTADO**

**ARTÍCULO III. GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF *SAMBUCUS
CANADENSIS* ETHANOL EXTRACT IN MERISTEM CELLS OF *ALLIUM
SATIVUM***

Del estudio de la información obtenida de este apartado, se realizó un artículo científico que fue enviado a la Revista ***Caryologia. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics***

Dicha revista se encuentra indexada en JCR; AgBiotechNet, Agroforestry Abstracts (Online), Animal Breeding Abstracts, Animal Science Database, ArticleFirst, Arts and Humanities Search, Biofuels Abstracts, Biological Abstracts (Online), Biological Abstracts (Online), BIOSIS Previews, Botanical Pesticides Abstracts, CAB Abstracts, CropPhysiology Abstracts, Crop Science Database, Current Contents, Environmental Impact, Field Crop Abstracts, Forest Products Abstracts, Forest Science Database, ForestryAbstracts, Global Health, Grasslands and Forage Abstracts (Online), Horticultural Science Database, Irrigation and Drainage Abstracts (Online), Nutrition and Food Sciences Database, Ornamental Horticulture (Online), Parasitology Database, Plant Breeding Abstracts (Online), Plant Genetics and Breeding Database, Potato Abstracts (Online), Review of Medical and Veterinary Entomology, Review of Plant Pathology (Online), ScienceCitation Index Expanded, Scopus, Seed Abstracts, Soil Science Database, Soils and Fertilizers (Online), Soybean Abstracts (Online), TropAg & Rural, Veterinary Science Database, Web of Science, Weed Abstracts, Zoological Record Online

Dipartimento di Biologia, Università di Firenze and our new publisher Firenze University Press make every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in our publications.

Genotoxicity and cytotoxicity of *Sambucus canadensis* ethanol extract in meristem cells of *Allium sativum*

Guadalupe Velázquez-Vázquez¹, Beatriz Pérez-Armendáriz¹, Verónica Rodríguez Soria¹ Anabella Handal-Silva² Luis Daniel Ortega¹ *

¹*Decanato de Ciencias Biológicas. Facultad de Biotecnología. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. 21 sur 1103 Col. Santiago. 72160. Puebla, México.*

²*Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 72570 Puebla, México.*

*Corresponding author: Luis Daniel Ortega

Guadalupe Velázquez-Vázquez: ORCID 0000-0001-9879-0968

Beatriz Pérez Armendáriz: ORCID 0000-0002-4956-2480

Verónica Rodríguez Soria: ORCID 0000-0002-2287-8338

Anabella Handal Silva: ORCID 0000-0002-6915-5655

Luis Daniel Ortega: ORCID 0000-0003-4672-8809

Abstract

The *Sambucus canadensis* species is used in traditional medicine mainly in indigenous communities as an anti-inflammatory, antiviral, to treat cough, fever and other ailments, however, its use must be validated on scientific bases. The aim of this study was to evaluate the genotoxic and cytotoxic effect of the ethanol extract of *Sambucus canadensis* in meristem cells of *Allium sativum* with 5 treatments at concentrations of 125, 250, 500, 1000 and 1500 mg/L. Two thousand cells were counted per treatment; the mitotic index (MI) and nuclear abnormalities (NA) were evaluated. Data were analyzed using variance analysis (ANOVA) and Chi square (X^2) ($p < 0.05$). Root growth was found to be inhibited based on the concentration with statistically significant differences ($p < 0.05$). As the dose and exposure time of the ethanol extract increased, the MI decreased. The NA increased at the highest concentrations of 500, 1000 and 1500 mg/L and these differences were statistically significant compared to the control ($p = 0.000$). With the results obtained, it can be shown that the species has antiproliferative effects and genotoxic activity on the *Allium sativum* cell cycle, which can be extrapolated to other types of eukaryotic cells. Therefore, despite being a plant with health benefits, moderate use and low concentrations are recommended to avoid harmful effects.

Key words: traditional medicine, chromosomal aberrations, biomodel, *Allium sativum*, genotoxicity, elderberry, plant extract.

INTRODUCTION

Medicinal plants are used by rural and urban populations in the treatment of numerous diseases (Chabán *et al.* 2019; Trap *et al.* 2020). In various parts of the world, they are the only source of medical care, mainly due to economic and geographical factors, customs and traditions (Marcotullio *et al.* 2018; Tedesco *et al.* 2017; Ullah *et al.* 2013). According to the World Health Organization (WHO), about 80% of the world's population uses herbal remedies as primary health care. The use of plants to treat diseases is still based on empirical knowledge, although they have been considered low risk compared to other synthetic drugs (De Smet 2007; Monroy *et al.* 2005, Newman and Cragg 2016). The scientific information available for most medicinal plants is still insufficient to guarantee their safe and efficient use (Moore *et al.* 2020; Pastori *et al.* 2013). Various studies have indicated the importance of evaluating their safety (Ganjhu *et al.* 2015; Huang *et al.* 2015; Neira *et al.* 2018; Palatini and Komarnytsky 2019; Soliman 2010; Sousa *et al.* 2011, Vazirian *et al.* 2018) due to possible risks associated with their components, which may be potentially toxic, mutagenic, carcinogenic or teratogenic (Abdelmigid 2013; Bratu *et al.* 2012; Prasansuklab *et al.* 2020). Among the medicinal plants with high curative potential is *Sambucus canadensis* (L.) Bolli. A native of Mexico belonging to the *Adoxaceae* family, it is commonly known as elderberry. This species has been used medicinally in indigenous communities as a bactericide, anti-inflammatory, against flu, cough, dysentery, fever, as well as in uses related to rituals for pregnant women (Álvarez-Quiroz *et al.* 2017; Lee and Finn 2007; Sánchez-González *et al.* 2008; Wu *et al.* 2004). Its antimicrobial, antiviral, antioxidant and chemopreventive activities, among others (Sidor *et al.* 2014; Tedesco *et al.* 2017; Thole *et al.* 2006) have been associated with the components present in the species such

as triterpenes, tannins and various types of flavonoids such as anthocyanins (Abdelmigid 2013; Ozgen 2010; Vujosevic *et al.* 2004), however, the presence of these compounds could also cause harmful effects such as nausea, vomiting and diarrhea, such as in the case of *Sambucus nigra* species, whose consumption in pregnant and lactating women, as well as in children and teenagers under 18 years of age, should be avoided (EMA/HMPC European Medicines Agency 2012). Information on toxicology, cytotoxicity and genotoxicity of *Sambucus canadensis* leaves is limited (Knudsen and Kaack 2015; Lee and Finn 2007; Schmitzer *et al.* 2012). It is important therefore to carry out studies to evaluate chromosomal damage and alterations of the mitotic cycle. According to Tedesco *et al.* (2015) Hister *et al.* (2017) Souza *et al.* (2010) Nefic *et al.* (2013) Pinho *et al.* (2010), the *Allium sp.* biomodel is a widely used, efficient, fast, low-cost method, with extrapolatable results since animal and plant chromosomes have similar structures. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of *Sambucus canadensis* on meristem cells of *Allium sativum*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The *Sambucus canadensis* (*L.*) *Bolli.* plant was collected in San Miguel Eloxochitlan in the Sierra Negra zone of Puebla, Mexico, coordinates 18°30'32"N and 96°55'22"W. The plant material was identified using taxonomic techniques and one specimen was deposited in the Arboretum of the University of Puebla Botanic Garden (JB-BUAP) with the ID: 83771.

Preparation of Sambucus canadensis extract

The leaves of *Sambucus canadensis* (*L.*) *Bolli.* were used. The extract was obtained by macerating the dry leaves with 4L of 96% ethanol with double filtering. The extracts were vacuum filtered with Whatman No. 4 paper, the supernatant was concentrated on a Buchi® rotary vapor under reduced pressure at 35 ± 15 °C and the ethanol extract evaporated *in vacuo*. Later, different concentrations of the extract were made, specifically, 125 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L and 1500 mg/L. Phytochemical tests were carried out for the qualitative identification of the different metabolite groups: alkaloids, Mayer, Dragendorff and Wagner tests; flavonoids, H₂SO₄, FeCl₃, and Shinoda; saponins, foam and Rosenthaler; coumarins, Baljet; triterpenes and/or sterols, Lieberman-Bouchard; tannins, Grignard. Each test was performed in triplicate (Carvajal *et al.* 2009; Patil and Bhise 2015). Fourier-transform mid-infrared spectroscopy (FTIR) from 4000 to 600 cm⁻¹ was used to obtain information about the functional groups present in the plant using a Bruker spectrometer at a resolution of 4 cm⁻¹. The analyses were done in the High Technology Service Center (CESAT-UPAEP).

Allium sativum bioassay

Meristem cells from the roots of *A. sativum* were used to evaluate the nuclear abnormalities (NA) and the mitotic index (MI) in the concentrations (125, 250, 500, 1000, 1500 mg/L); water was used as a control. Five repetitions were performed on each concentration with bulbs of uniform size (3 cm in diameter). The control bulbs were kept in water.

The other bulbs were transferred to the different concentrations for 120 hours. At the end of exposure, the length of the roots and stem were measured and examined to detect visible morphological anomalies: changes in consistency and root color and the presence of hooks or twists in the roots as a sign of general toxicity (Çelik and Aslantürk 2010). Subsequently, the meristem zone of the garlic roots (2 mm) was cut and placed on a slide, hydrolyzed in 1N HCl for 10 minutes, then washed with distilled water, and stained with acetic orcein. The slides were fixed with the squash method sealing the edges with resin. The samples were analyzed with a Leica DM1000 LED fluorescence optical microscope with a Jenoptik ProGres C10 digital camera. Some 2000 meristem cells were counted for each treatment. In the stages of mitosis (interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase), the cellular alterations were counted: chromosomal breakage, bridges, lagging chromosomes, strays, among others. The values obtained were used to calculate the mitotic indices (MI) and the percentage of cellular alterations (CA) with the following formulae:

$$MI = \text{Number of cells in mitosis} \div \text{Total cells} \times 100$$

$$CA = \text{Number of cells with abnormal chromosomes} \div \text{Total cells} \times 100$$

The results of the number of roots and length of roots and stem, and the mitotic index were analyzed with the ANOVA. The differences were evaluated with Dunnett's post hoc test. The nuclear abnormalities were evaluated with the Chi-squared test (X^2) using the Minitab 8.1 statistics program. Values of $p < 0.05$ were considered significant differences.

RESULTS

The phytochemical tests of the *Sambucus canadensis* extract revealed the presence of alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. The infrared spectrum tests (FTIR) on the extract showed different frequencies of stretching and bending; the stretching frequencies of the O-H bond at 3350 cm^{-1} is associated with phenol groups; the involvement in hydrogen bonding produces a widening of the band. The C-H bond stretching vibrations corresponding to methyl and methylene groups appear in the $3000\text{--}2850 \text{ cm}^{-1}$ range and the bands in the fingerprint region are due to the bending vibrations at 1386 cm^{-1} for methyl and 716 cm^{-1} for ethyl: the stretching vibrations of the carbonyl bond, C=O, appears in the $1750\text{--}1680 \text{ cm}^{-1}$ range related to the presence of flavonoids. Similarly, a conjugated double bond C=C of the aromatic rings appears in the $1600\text{--}1450 \text{ cm}^{-1}$ range, characteristic of the basic structure of flavonoids (Figure 1).

The length of *Allium sativum* roots and stem at the 1000 and 1500 mg/L concentrations were 7.66 mm and 0.72 mm, respectively, showing statistically significant differences compared to the control ($p = 0.000$). There were no significant differences with the other treatments ($p > 0.05$). The stem length at a concentration of 1500 mg/L (2.36 mm) showed a statistically significant difference compared to the stem length of the control group ($p = 0.000$). It can be seen that the average length and number of roots decreased depending on the concentration (Table 1). In terms of morphology, at concentrations of 125 and 250 mg/L no differences were observed compared to the control, however, at concentrations of 500 and 1000 mg/L the roots appeared yellow, at 1500

mg/L the sparse roots were brown and stiff. Likewise, effects on the stem such as twisting and color change were observed, mainly at concentrations of 1000 and 1500 mg/L.

Regarding the results of the mitotic index, Table 2 shows a decrease in the MI as concentration increases; the number of dividing cells (prophase, metaphase, anaphase and telophase) differed between concentrations, however, at 125, 250 and 500 mg/L there were no significant differences compared to the control ($p > 0.05$). At a concentration of 1500 mg/L a statistically significant difference was observed in the mitotic index compared to the control.

The nuclear abnormalities in *Allium sativum* are shown in Table 3. Concentrations of 500, 1000 and 1500 mg/L of the ethanol extract had the highest number, concentrations of 125 and 250 mg/L a lesser amount. The number of cells in mitosis with anomalies was related to the increase in concentration. Figure 2 shows abnormalities such as breakage, chromosome loss, bridges, stray and stranded chromosomes, among others.

Table 1. Number and length of roots, and stem length of *A. sativum* exposed to the ethanol extract of *Sambucus canadensis*.

Treatment mg/L	Number of roots (\bar{x}) (δ)	Length of roots (\bar{x}) (δ)	Stems length (\bar{x}) (δ)
125	13.2 ± 2.66	15.82 ± 724	25.52 ± 17.54
250	9.84 ± 4.94	11.47 ± 6.12	18.76 ± 10.81
500	11.20 ± 6.81	19.76 ± ±12.95	20.8 ± 12.62
1000	7.36 ± 3.68	8.66 ± 10.32*	17.6 ± 8.43
1500	0.92 ± 0.90 *	0.72 ± 0.42 *	2.36 ± 0.46*
Control	13.4 ± 7.96	25.84 ± 19.79	36.3 ± 44.25

Values are mean ± S.E, One way ANOVA (*) are not significantly different $p < 0.05$

Table 2. *Allium sativum* merismatic cell numbers in the different cell cycle phases, and index mitotic extract of *Sambucus canadensis*.

Treatment mg/L	Interphase	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Cells in division	Mitotic Index (%)
-------------------	------------	----------	-----------	----------	-----------	----------------------	----------------------

Control	3831	1988	81	59	41	2169	36,1
125	4020	1840	66	39	35	1980	33
250	4356	1571	29	23	21	1644	27,4
500	4306	1580	58	34	32	1704	14,3
1000	4558	1330	36	15	21	1402*	12,0
1500	5398	556	17	13	16	602*	5,03

*p <0.05 in One Way ANOVA

Table 3. Cellular abnormalities observed in *Allium sativum* exposed to the ethanolic extract of *Sambucus canadensis*.

	Treatments mg/L					
	Control	125	250	500	1000	1500
Number of cells in division	2169	1980	1644	1704	1442	602
Bridges	-	-	1	4	37	25
Chromosome fragments	-	-	2	-	4	5
Binucleate	2	3	24	99	40	30
Chromosome lagging and disoriented	2	1	1	7	7	4
Sticky chromosome	-	1	-	1	5	2
Vagrant chromosome	-	-	-	2	3	4
Trinucleated	-	-	-	10	5	20
Total cells aberrations	4a	5a	28b	123b	101b	90b
Cells aberration (%)	0,2	0,3	1,7*	7,2*	7,0b	15,0b

* The chi-square test. Significant difference p <0.05

DISCUSSION

The test with *Allium spp.* is a suitable biomodel for identifying the cytotoxic and genotoxic effects of different plants (Trapp *et al.* 2020; Bagatini *et al.* 2007; Lubini *et al.* 2008). The study of raw extracts is important since traditional medicine uses part of the plant structure (leaves, stem, root) or the whole plant, without separating

its components. Furthermore, it has been shown that different bioactive compounds act synergistically (Tallarida 2011) and that a combination of compounds exhibits a greater effect than individual compounds, suggesting that the effects of some plants are the result of the interaction of their components (Lamy *et al.* 2018).

In this study, the qualitative analyses (phytochemical tests; FTIR) of the plant showed the presence of alkaloids, tannins, saponins and flavonoids. The spectroscopy used provides important information about functional groups as well as being an accessible and useful technique in the chemical and structural analysis of plants (Günzler and Gremlich 2002; Heredia-Guerrero *et al.* 2014). The functional group associated with the signals reported in the evaluated spectra (FTIR) is flavonoids, which present inhibitory activity against diverse fungi and bacteria species. The metabolites reported (alkaloids, tannins, saponins, flavonoids) showed antimicrobial, antioxidant and antiviral activity, among others. Flavonoids in particular exhibit important pharmacological activities, in addition to being effective in chemoprevention and chemotherapy (Paduch *et al.* 2007; Perveen 2018). The evaluation of the *S. canadensis* extract with the *Allium sativum* test allowed us to determine the effects on root and stem growth as well as morphology; the highest concentrations, 1000 and 1500 mg/L, significantly inhibited root and stem growth compared to the control. The mitotic index (MI) decreased significantly as the concentration of *Sambucus canadensis* increased, matching the results reported for other species of *Sambucus sp.* (Tedesco *et al.* 2017; Thole 2006). Other authors have reported that plant extracts such as *P. leiocarpa* and *P. myriantha* (Lubini *et al.* 2008), *Campomanesia xanthocarpa* (Pastori *et al.* 2013), *Vernonanthura polyanthes* (Almeida *et al.* 2020), *Amaranthus spinosus* (Prajitha and Thoppil, 2016), *Achyrocline satureioides* (Fachinetto *et al.* 2007), *Luehea divaricata* (Frescura *et al.* 2012) caused a reduction in the mitotic index when increasing the concentration, which may be an indication of antiproliferative activity such as that reported by Bagatini *et al.* (2009), Knoll *et al.* (2006). The results obtained in this study may be associated with the plant components; in this sense, the flavonoids found in the FTIR analysis may inhibit or stimulate the cellular cycle. Tedesco *et al.* (2017) found that *Sambucus australis* has flavonoids such as rutin, kaempferol and quercetin, among others, to which different pharmacological effects have been attributed, including antiproliferative and anticancer action. One study developed by Lee and Finn, (2007) reported that *Sambucus canadensis* presents a high quantity of anthocyanins and polyphenols which have a potent antioxidant effect, perhaps also explaining the inhibition of cellular division in *Allium sativum*. In the same way, the phenolic components of the species have been associated with a more potent anticancer activity than *Sambucus nigra* (Thole *et al.* 2006).

The main chromosomal aberrations found in this study include the formation of bridges, which, according to Türkoğlu (2007), are produced due to the fusion of chromosomes or chromatids as a result of chromosomal stickiness or due to unequal translocation. Lagging chromosomes moving to both sides of the poles without being fused by the spindle apparatus can also induce bridges. Another aberration found in the results of this investigation were sticky chromosomes formed by the free movement of chromosomes, which can produce chromosomal breakage and may lead to the loss of genetic material (Dutta *et al.* 2018). Stray chromosomes

advance ahead of the chromosome group towards the poles resulting in an unequal distribution of chromosomes in daughter cells (Sondhi *et al.* 2018).

Similarly, Fachinetti and Tedesco (2009) attribute various chromosomal anomalies, bridges, binucleated cells, among others, to the components of the plants. Along these lines, Toloza *et al.* (2006), Bagatini *et al.* (2009) indicate that the genotoxic and antiproliferative activity presented by some plant extracts are the result of the interactions of their different chemical components. In this regard, Amado *et al.* (2020) reported that the *Smilax brasiliensis* extract and the rutin and quercetin fractions, which have also been found in the species *Sambucus sp.* cause genotoxic effects. It has been suggested that, if extracts cause damage to plant cell chromosomes, they may also be potentially harmful for mammalian cell chromosomes (Feretti *et al.* 2007).

According to the results, no abnormalities in the *A. sativum* root were found at low concentrations of 125 mg/L and 250 mg/L. However, in concentrations of 500, 1000 and 1500 mg/L, a considerable number of alterations, such as bridges, chromosome breaks and strays were found, suggesting that the extract presents a genotoxic effect at high concentrations. The results match those reported by Bratu (2012) which indicate that at low concentrations the species *Sambucus nigra* presents no mutagenic effects. According to Ifeoluwa *et al.* (2013) and Sabini *et al.* (2011), some plants induce cytotoxicity but not mutagenic effects. Generally speaking, the frequency of aberrations increases significantly as the concentration increases, suggesting that *Sambucus canadensis* leaf extract presents clastogenic effects, which agrees with the reports of Bidau *et al.* (2004), Çelik and Aslantürk (2010) and Mattana *et al.* (2014) on the effects of herbal plants.

Sambucus canadensis is a plant that should be used with caution not only because it is used for curing diseases but also because it is used by pregnant women (Velazquez-Vázquez *et al.* 2019) and could be harmful to their health. The use of plants before and after pregnancy may cause conditions from vomiting, infection and gastrointestinal problems to placental retention, uterine hypotonia, cervical tear, miscarriage, uterine bleeding and others. Since few studies exist on the safety and efficacy of the use of herbal plants during pregnancy, a situation which exposes both the mother and the fetus, it is recommended that they are not used during pregnancy unless such use is supported by scientific studies which validate their safety (Ahmed *et al.* 2017; Hall *et al.* 2011; Illamola *et al.* 2020; Frawley *et al.* 2015; Nergard *et al.* 2015)

CONCLUSION

The results of this study suggest that the ethanol extract from *Sambucus canadensis* induces antiproliferative effects. It was also found that in concentrations higher than 500 mg/L the extract affects root growth, cellular division and chromosomal changes in the cells of *Allium sativum*. It is important to know the effects of plants that are used as the primary source of medical care in order to contribute to the regulation of their use and consumption as an important measure for protecting human health.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

- Abdelmigid HM. 2013. New insights into Toxicity and Drug Testing. Chapter 5. 89-253. <http://dx.doi.org/10.5772/54858>
- Ahmed S, Hasan MM, Mahmood ZA. 2017. Antiuroliithiac plants of family Fabaceae: A memoir of mechanism of action, therapeutic spectrum, formulations with doses. J. Pharmacogn. Phytochem. 6(3): 592-596.
- Alvarez-Quiroz V, Caso-Barrera L, Aliphath-Fernández M, Galmiche-Tejeda A. 2017. Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 16 (4): 428 – 454.
- Amado PA, Castro AH F, Zanuncio VSS, Stein VC, da Silva DB, dos Santos Lima LAR. 2020. Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves. Ecotoxicol Environ Saf 192: 110310
- Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn. 17:444-447.
- Bagatini MD, Vasconcelos TG, Laughinghouse IV HD, Martins AF, Tedesco SB. 2009. Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* test. Bull Environ Contam Toxicol 82:590–592.
- Bidau AG, Amat M, Yajia DA, Marti AG, Riglos A. 2004. Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) using the *Allium* test Cytologia 69(2): 109–117, 2004
- Bratu MM, Doroftei E, Negreanu-Pirjol T, Hostina C, Porta S. 2012. Determination of antioxidant activity and toxicity of *Sambucus nigra* fruit extract using alternative methods. Food Technol Biotech 50: 177–182.
- Chabán MF, Karagianni C, Joray MB, Toumpa D, Solá C, Crespo MI, Carpinella MC. 2019. Antibacterial effects of extracts obtained from plants of Argentina: Bioguided isolation of compounds from the anti-infectious medicinal plant *Lepechinia meyenii*. J Ethnopharmacol 239 (111930):2-9 doi:10.1016/j.jep.2019.111930
- Çelik TA, Aslantürk ÖS. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* test. J Biomed Biotechnol 189252: 1–8. doi:10.1155/2010/189252
- De Smet PAGM (2007) Clinical risk management of herb–drug interactions. Br J Clin Pharmacol 63: 258-267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02797.x>
- EMA/HMPC European Medicines Agency. 2012. Assessment report on *Sambucus nigra* L., fructus. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2013/04/WC500142245.pdf.
- Fachinnetto JM Tedesco SB. 2009. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. Rev. bras. plantas med 11: 360–367
- Ganjhu RK, Mudgal PP, Maity H, Dowarha D, Devadiga S, Nag S, Arunkumar. 2015. Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. Virus Disease 26 (4): 225-236
- Carvajal R, Hata Y, Sierra N, Rueda D. 2009. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* krukoff). Rev Colombiana Forestal 12: 161-170

- Huang J, Zheng Y, Wu W, Xie T, Yao H, Pang X, Sun F, Ouyang L, Wang J. 2015. The database for elucidating the relationships among herbs, compounds, targets and related diseases for Chinese ethnic minority traditional drugs. *Oncotarget* 6:17675-17684.
- Hister CAL, Boligon AA, Laughinghouse IV HD, Tedesco SB. 2017. Determination of phenolic compounds and assessment of the genotoxic and proliferative potential of *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) fruits. *Caryologia* 70(4):350-356
- Knudsen BF, Kaack KV. 2015. A review of human health and disease claims for elderberry (*sambucus nigra*) fruit. (June). International symposium on elderberry 1061:121–131. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1061.12>.
- Bratu MM, Doroftei E, Negreanu-Pirjol T, Hostina C, Porta S. 2012. Determination of Antioxidant Activity and Toxicity of *Sambucus nigra* Fruit Extract Using Alternative Methods. *Food Technol Biotech* (2): 177-182.
- Baranska M, Schultz H. 2006. Application of infrared and Raman spectroscopy for analysis of selected medicinal and spice plants. *Journal of Medicinal & Spice Plants*. 2: 72–80
- Dutta J, Ahmad A, Singh J. 2018. Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. *Caryologia* 71(2):139–145. DOI: 10.1080/00087114.2018.1447631
- Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB. 2007. Antiproliferative effect of infusion of *Achyrocline satureoides* on the *Allium cepa* cell cycle. *Braz. J. Pharmacognosy* 17: 49–54.
- Feretti D, Zerbini I, Zani C, Ceretti, Moretti M, Monarca S. 2007. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addit Contam* 24(6):561-572, DOI: 10.1080/02652030601113602
- Frescura VD, Laughinghouse IV, Tedesco SB. 2012. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. *Caryologia* 65: 27-33
- Frawley J, Adams J, Steel A, Broom A, Gallois C, Sibbritt D. 2015. Women’s use and self-prescription of herbal medicine during pregnancy: an examination of 1,835 Pregnant Women. *Women’s Health Issues* 25 (4): 396–402. 10.1016/j.whi.2015.03.001
- Hall HG, Griffiths DL, McKenna LG. 2011. The use of complementary and alternative medicine by pregnant women: a literature review. *Midwifery* 27(6):817-24. doi: 10.1016/j.midw.2010.08.007.
- Heredia-Guerrero JA, Benítez José J, Domínguez E, Bayer Ilker S, Cingolani R, Athanassiou A, Heredia A. 2014 Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front. Plant Sci* 5: 305-315.
- Ifeoluwa T, Oyeyemi A, Bakare A. 2013. Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells, *Caryologia*, 66:4, 360- 367, DOI: 10.1080/00087114.2013.857829
- Illamola SM, Amaeze OU, Krepkova LV, Birnbaum AK, Karanam A, Job KM, Bortnikova VV, Sherwin CMT, Enioutina EY. 2020. Use of Herbal Medicine by Pregnant Women: What Physicians Need to Know. *Front Pharmacol*. 9(10):1483. doi: 10.3389/fphar.2019.01483.
- Knoll MF, Silva ACF, Canto-Dorow TS Tedesco SB. 2006. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genet Mol Biol* 29: 539-542.

- Lamy S, Muhire É, Annabi B. 2018. Antiproliferative efficacy of elderberries and elderflowers (*Sambucus canadensis*) on glioma and brain endothelial cells under normoxic and hypoxic conditions. *J Funct Foods* 40:164–179. doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.048
- Lee J, Finn CE. 2007. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *J Sci Food Agric.* 87:2665- 2675
- Lubini G, Fachinetto J, Laughinghouse H, Paranhos J, Silva A, Tedesco S. 2008. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia* 63: 647-651.
- Mattana CM, Cangiano MA, Alcaráz LE, Sosa A, Escobar F, Sabini C, Sabini L, Laciari AL. 2014. Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Acacia aroma* Leaf Extracts. *Sci WorldJ* 2014: 380850 doi.org/10.1155/2014/380850
- Marcotullio MC, Curini M, Becerra JX. 2018. An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera* spp. *Molecules* 8;23(8):1976. doi: 10.3390/molecules23081976.
- Monroy C, Cortés AC, Sicard D, Groot H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25(3):335-345.
- Moore EM, Wagner C, Komarnytsky S. 2020. The Enigma of Bioactivity and Toxicity of Botanical Oils for Skin Care. *Front Pharmacol.* 11:785. doi: 10.3389/fphar.2020.00785.
- Newman DJ, Cragg GM. 2014. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79(3):629-661.
- Neira LF, Mantilla JC, Stashenko E, Escobar P. 2018. Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-Leishmania de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género *Lippia*. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 17 (1): 68–83
- Nefic H, Musanovic J, Metovic A, Kurteshi K. 2013. Chromosomal and nuclear alternations in root tip cells of *Allium cepa* L. induced by alprazolam. *Med. Arch.* 67:388–392. <https://doi.org/10.5455/medarh.2013.67.388-392>
- Nergard C. S, Ho T. P. T, Diallo D, Ballo N, Paulsen B. S. Nordeng H. 2015. Attitudes and use of medicinal plants during pregnancy among women at health care centers in three regions of Mali, West-Africa. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 11 (73) 10.1186/s13002-015-0057-8
- Ozgen M., Scheerens J, Reese N, Miller R. 2010. Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacogn Mag* 6(23): 198. doi:10.4103/0973-1296.66936.
- Paduch R, Kandefor-Szerszen M, Trytek M, Fiedurek J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55(5): 315-327
- Prasansuklab A, Brimson JM, Tencomnao T. 2020. Potential Thai medicinal plants for neurodegenerative diseases: A review focusing on the anti-glutamate toxicity effect. *J. Tradit. Complement. Med* 10 (3) 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.03.003>
- Patil RS, Bhise KK. 2015. Evaluation of phytochemicals and in vitro antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extract from seeds of *Ricinus communis* Linn. *Eur J. Biotechnol Biosci.* 3:19-23

- Pastori T, Flores FC, Boligon AA, Athayde ML, daSilva CdeB, Canto-Dorow TS, Tedesco SB. 2013. Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system. *Pharmac Biol* 51(10):1249–1255 DOI: 10.3109/13880209.2013.786097
- Perveen S. 2018. Introductory chapter: terpenes and terpenoids. London: IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71175>.
- Pinho DS, Sturbelle RT, Martino-Roth MG, Garcias GL. 2010. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. *Rev Bras Farmacogn* 20: 65-170.
- Roschek B, Fink CR, McMichael MD, Li D, Alberte RS. 2009. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry* 70:1255–1261.
- Sánchez-González A, Granados-Sánchez D, Simón-Nabor R. 2008. Uso medicinal de las plantas por los otómefes del municipio de Nicolas Flores, Hidalgo, Mexico. *Rev Chapingo Ser Hortic* 14(3): 271-279.
- Socaciu C, Ranga F, Fetea F, Leopold L, Dulf F, Parlog R. 2009. Complementary advanced techniques applied for plant and food authentication. *Czech J. Food Sci.* 27: S70-S75
- Soliman AH. 2010. Mutagenic efectos of *Cocía indica* extracto en *Vicia faba* L. *J. Am. Sci* 6(7): 292 – 297.
- Schmitzer V, Veberic R, Slatnar A, Stampar F. 2010. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Wine: A Product Rich in Health Promoting Compounds. *J Agric Food Chem.* 58:10143-10146
- Sousa SM, Viccini LF. 2011. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* L., Asteraceae, aqueous extracts. *Rev. Bras. Farmacogn* 21(1): 98-104.
- Souza LFB, Laughinghouse IV HD, Pastori T, Tedesco M, Kuhn AW, Canto-Dorow TS, Tedesco SB. 2010. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. *Int J Environ Stud.* 67:871-877.
- Sondhi N, Bhardwaj R, Kaur S, Kumar N, Singh B. 2008. Isolation of 24-epibrassinolide from leaves of *Aegle marmelos* and evaluation of its anti genotoxicity employing *Allium cepa* chromosomal aberration assay. *Plant Growth Regul.* 54(3):217–224. doi:10.1007/s10725-007-9242-7.
- Sidor A, Gramza-Michałowska A. 2014. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *J. funct foods.* 18:941–958. doi: 10.1016/j.jff.2014.07.012
- Trapp KC, Hister CAL, Laughinghouse IV, Boligon AA, Tedesco SB. 2020. Determination of phenolic compounds and evaluation of cytotoxicity in *Plectranthus barbatus* using the *Allium cepa* test. *Caryologia* 73(2): 145-153. doi: 10.13128/caryolo- gia-947
- Tedesco M, Kuhn AW, Frescura VD, Boligon AA, Athayde ML, Tedesco SB, Silva ACF. 2017. Assessment of the antiproliferative and antigenotoxic activity and phytochemical screening of aqueous extracts of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. (Adoxaceae). *An. Acad Bras Cienc* 89(3)2141-2154. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720150138>.
- Thole JM, Kraft TF, Sueiro LA, Kang YH, Gills JJ, Cuendet M, Pezzuto JM, Seigler DS, Lila MA. 2006. A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *J Med Food* 9:498–504

- Tolozan AC, Zygaldo J, Cueto GM, Biurrun F, Zebra E, Picollo MI. 2006. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin: resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J Med. Entomol* 43: 889–895
- Ullah M, Khan, MU, Mahmood A, Malik RN, Hussain M, Wazir SM, Shinwari ZK. 2013. An ethnobotanical survey of indigenous medicinal plants in Wana district south Waziristan agency, Pakistan. *J Ethnopharmacol*, 150(3), 918–924. doi:10.1016/j.jep.2013.09.032
- Velázquez-Vázquez G, Pérez-Armendariz B, Ortega-Martínez LD, Nelly-Juárez Z. 2019. Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *B. Latinoam Caribe Pl.* 18: 265 –276.
- Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. 2004. Characterization of anthocyanins and procyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem* 52: 7846-7856.
- WHO (World Health Organization) 2016. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Ginebra, Switzerland.
- Turkoglu S. 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tip of *Allium cepa*. *Mutat Res.* 626:414–424. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.07.006
- Tallarida RJ. 2011. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer* 2(11): 1003–1008. <http://dx.doi.org/10.1177/1947601912440575>.
- Thole JM, Kraft TFB, Sueiro LA, Kang Y-H, Gills JJ, Cuendet M, Pezzuto JM, Seigler DS, Lila MA. 2006. A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *J Med Food* 9:498-504
- Vazirian M, Hekmati D, Ostad S, Manayi A. 2018. Toxicity Evaluation of Essential oil of *Trachyspermum ammi* in Acute and Sub-chronic Toxicity Experiments. *J. Med. Plants.* 18(69):70-77
- Vujosevic M, Blagojevic J. 2004. Antimutagenic effects of extracts from sage (*Salvia officinalis*) in mammalian system in vivo. *Acta Vet Hung.* 52: 439-443
- Zhu MZ, Wu W, Jiao LL, Yang PF, Guo MQ. 2015. Analysis of flavonoids in lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves and their antioxidant activity using macroporous resin chromatography coupled with LC-MS/MS and antioxidant biochemical assays. *Molecules (Basel, Switzerland)* 20(6): 10553-10565.

4TO ARTICULO

ARTÍCULO IV. ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF EXTRACT VEGETAL AGAINST A SELECTION OF FOODBORNE MICROORGANISMS

Antimicrobial and antibiofilm activities of extract vegetal against a selection of foodborne microorganisms

Guadalupe Velázquez-Vázquez¹, Elena Ortega Morente³, Antonio Cobo Molinos^{2,3},
Verónica Rodríguez Soria¹ Beatriz Pérez-Armendáriz ¹

1Decanato de Ciencias Biológicas. Facultad de Biotecnología. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. 21 sur 1103 Col. Santiago. 72160. Puebla, México.

2Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España-

3Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, España.

*Corresponding author: Elena Ortega Morente

Guadalupe Velázquez-Vázquez: ORCID 0000-0001-9879-0968

Beatriz Pérez Armendáriz: ORCID 0000-0002-4956-2480

Verónica Rodríguez Soria: ORCID 0000-0002-2287-8338

Elena Ortega Morente: ORCID 0000-0001-6281-5000

Antonio Cobo Molinos: ORCID 0000-0003-3360-7186

Resumen

Los patógenos transmitidos por los alimentos forman biopelículas con una alta resistencia a biocidas, desinfectantes y antibióticos. Los extractos vegetales pueden ser una alternativa potencial para combatirlos. En este estudio se evaluó la actividad anti-biopelícula de un extracto vegetal (*Sambucus canadensis*) utilizado ampliamente en comunidades indígenas de México para tratar distintos malestares. El crecimiento y desarrollo de la biopelícula se evaluó mediante ensayos de tinción de cristal violeta (CV). Se observó actividad antibacteriana y anti-biopelícula sobre todas las cepas evaluadas, se encontró una inhibición de la formación de biofilm significativa ($p < 0.05$) en todas las concentraciones probadas frente a *S. enterica* CECT 4395, *S. enterica* CECT 405, *B. cereus* CECT 277, *Klebsiella* UJA32j y *Pantoea* UJA29o, el menor porcentaje de formación de biopelícula fue de 27% para *B. cereus*. El extracto también mostró actividad de disgregación de biopelículas previamente formadas frente a las cepas *E. coli* CECT 47557 y *Enterobacter* UJA 37p, menor al 30% en todas las concentraciones evaluadas, las demás cepas también reportaron un porcentaje de disgregación menor al 50%. Los resultados encontrados indican que el extracto vegetal tiene un alto potencial de actividad anti-biopelícula frente a bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos y plantean riesgos para la salud de las personas.

Palabras clave: anti biopelícula, extracto vegetal, disgregación, formación.

1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son un problema mundial que ocasiona un gran impacto en la salud de las personas (Ritter y Tondo, 2014, Pui et al., 2011, WHO, 2017). Existe una gran cantidad de patógenos que afectan la inocuidad de los alimentos por su capacidad para sobrevivir frente a distintos tipos de estresores, así como su alta capacidad para formar biopelículas. En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de las biopelículas principalmente por la gran resistencia que presentan frente a diversos tipos de antibióticos (Caraher et al., 2007, Lahiri et al., 2019, Vasudevan et al., 2014). Las biopelículas son una densa población de células bacterianas sésiles que se adhieren a la superficie, formando una matriz compuesta por exopolisacárido, proteínas y ADN, la cual proporciona estabilidad y nutrientes a las células que se adhieren (Bjarnsholt et al., 2005, Kavanaugh y Ribbeck, 2012). Estas comunidades bacterianas pueden penetrar rápidamente en una amplia variedad de lugares del entorno, incluido el cuerpo humano. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud (NIH) alrededor del 80% de las infecciones de tejidos blandos y duros en humanos son causadas por biopelículas patógenas. Las biopelículas promueven la persistencia bacteriana al resistir las respuestas inmunitarias del huésped y el tratamiento con antibióticos generalmente se vuelve ineficaz (Donlan et al., 2002, Ortega-Vidal et al., 2021). Asimismo, debido las biopelículas sésiles muestran una mayor resistencia a muchos biocidas, desinfectantes y antibióticos (Amaral et al., 2015). Una alternativa para la prevención y control de biopelículas son los productos derivados de fuentes naturales (extractos vegetales). Diversos estudios han reportado la actividad antimicrobiana contra distintos patógenos (Al-Dhabi et al., 2015, Elhariry et al., 2014, Naz et al., 2010). Incluyendo actividad en la formación y disgregación de biopelículas contra cepas como *E. coli*, *S. aureus*, *Candida* sp. entre otras (Adukwu et al., 2012, Bazargani et al., 2015, Rudrappa y Bais, 2008). Sin embargo, a pesar del potencial de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos antimicrobianos limitados extractos vegetales se han desarrollado como microbicidas con actividad antibiofilm y un gran número de plantas aún no han sido evaluadas. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad anti-biopelícula de un extracto vegetal *Sambucus canadensis* (L.) conocido comúnmente como “sauco”. Esta especie ha sido reportada con actividad antimicrobiana, antiviral, antioxidante, quimiopreventiva, entre otras, los cuales

han sido asociadas a los componentes presentes en la especie tales como triterpenos, taninos y diversos tipos de flavonoides (Abdelmigid, 2013, Lee and Finn, 2007, Wu et al. 2004, Sidor et al. 2014, Tedesco et al. 2017, Ozgen, 2010). Sin embargo, no se han reportado estudios de la especie sobre la actividad anti-biopelícula frente a bacterias que afectan la inocuidad de los alimentos.

2. Material y Métodos

2.1 Material vegetal y extracción

La planta de *Sambucus canadensis* (L.) *Bolli.* fue colectada en la zona de la Sierra Negra de Puebla, México (figura 1). El material vegetal fue identificado por medio de técnicas taxonómicas y un espécimen fue depositado en el Herbario del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con el ID: 83771. Para obtener el extracto las hojas secas fueron maceradas con 4L de etanol al 96% con doble filtrado. Los extractos se filtraron al vacío con papel Whatman N° 4, el sobrenadante se concentró en un rota vapor Buchi® a presión reducida a 35 ± 15 °C, el extracto etanólico fue evaporado al vacío. Para la identificación cualitativa de los diferentes grupos de metabolitos se realizaron pruebas fitoquímicas: Alcaloides; prueba de Mayer, Drangendorff y Wagner, para Flavonoides; prueba del H₂SO₄, FeCl, y Shinoda, para Saponinas; prueba de espuma y Rosenthaler, Cumarinas; prueba de Baljet, Triterpenos y/o Esteroles; prueba de Lieberman-Bouchard, Taninos; Grignard. Cada prueba se realizó por triplicado (Carvajal et al. 2009, Patil and Bhise, 2015). Para obtener información sobre grupos funcionales asociadas a los compuestos fitoquímicos presentes en la planta se utilizó el espectro en el Infrarrojo región media con transformada de Fourier (TFIR) en un espectrómetro marca Bruker de 4000 a 600 cm⁻¹ con resolución de 4 cm⁻¹, Los análisis se realizaron en el departamento de Centro de Servicios de Alta Tecnología (CESAT-UPAEP).

2.2 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del extracto vegetal se analizó inicialmente por el método de difusión en agar y luego fue sometido a la prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC). La actividad antimicrobiana del extracto se evaluó con 2 colecciones pertenecientes al laboratorio de Microbiología de los alimentos y del medio Ambiente de la Universidad de

Jaén; la colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la colección de cepas previamente aisladas a partir de alimentos orgánicos con una alta tolerancia a los biocidas y resistencia a los antibióticos (Fernández-Fuentes et al.,2012). Las cepas bacterianas se enumeran en la Tabla 1. Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se diluyeron en serie en caldo de soja tríptico (TSB) (Scharlab, Barcelona, España) para efectos antimicrobianos y antibióticos.

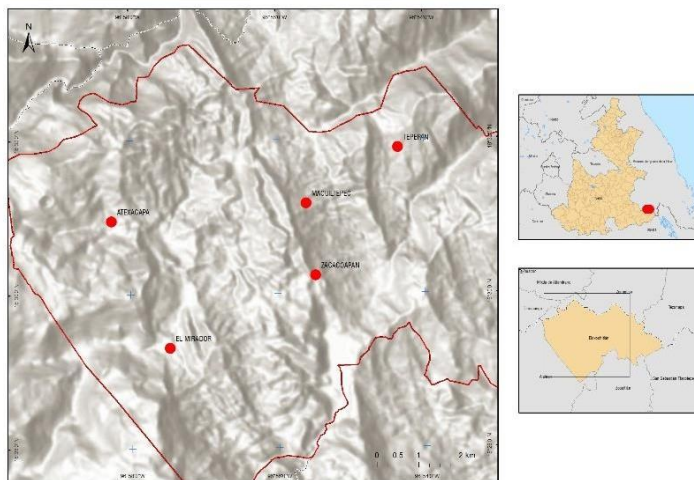


Figura 1. Localización del sitio de estudio en donde se colecto la especie *Sambucus canadensis*, San Miguel Eloxochitlan, Puebla, México.

2.3 Prueba de concentración mínima inhibitoria

Se realizaron pruebas preliminares de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar estándar para obtener las concentraciones óptimas del extracto vegetal que posteriormente serian utilizadas en las pruebas de CMI. Los valores mínimos de concentración inhibitoria se determinaron mediante el método de microdilución en caldo (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.) Según lo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Cepas utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana y anti biopelículas pertenecientes a dos tipos de colecciones del Laboratorio de Microbiología de los alimentos.

Cepas pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

<i>Salmonella enterica</i>	CECT 915
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4300
<i>Salmonella enterica</i>	CECT 4395
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47553
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 47557
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 976
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 4465

Cepas resistentes aisladas de alimentos orgánicos

<i>Bacillus cereus</i>	UJA 27q
<i>Enterococcus faecium</i>	UJA 11c
<i>Lactobacillus casei</i>	UJA 35h
<i>Enterobacter sp.</i>	UJA 37p
<i>Pantoea agglomerans</i>	UJA 29o
<i>Klebsiella terrigena</i>	UJA 32j

2.4 Ensayo de inhibición de la formación de biopelículas

Se analizó el extracto vegetal diluido en serie en un rango de 100 a 0.01 µg/ml, según el valor de MIC obtenido previamente, para determinar la capacidad de los compuestos para obstruir la formación de biopelículas y también su potencial para disgregar biopelículas previamente formadas, como lo describen Ulrey et al. (2014). La inhibición de la formación de biopelículas inducida por compuestos aislados se midió mediante el método de tinción de violeta cristal descrito por Djordjevic et al. (2002) con algunas modificaciones. Posteriormente se incubaron suspensiones bacterianas (10^6 UFC en TSB) con concentraciones crecientes del extracto (24 h, 30 °C). Los pocillos con suspensiones bacterianas y medio TSB se ejecutaron en paralelo como controles positivos para la formación de biopelículas. Todos los pozos se lavaron con agua del grifo y las biopelículas se fijaron con metanol. La placa se tiñó con cristal violeta al 0,3% y se leyó en un iMarkMicroplate Reader (Bio-Rad, Madrid, España) DO 595 nm.

2.5 Ensayo de la disgregación de películas formadas previamente

La ruptura de la biopelícula formada previamente se analizó como se describió anteriormente. Después de la formación de la biopelícula (24 h, 30 °C) en una placa de microtitulación de 96 pocillos, el contenido se aspiró y los pocillos se lavaron suavemente dos veces con solución salina fisiológica estéril, se añadieron 100 µl del compuesto diluido apropiado, los pozos sin el extracto sirvieron como controles positivos. Después de una incubación de 24 h, 30 °C, se realizó la tinción de violeta cristal descrita anteriormente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Con los datos obtenidos se obtuvieron medias y desviaciones estándar de las absorbancias a una DO de 595 nm. Para analizar los resultados de la significancia estadística se utilizó una prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95% con Statgraphics Plus versión 8.1 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE. UU.).

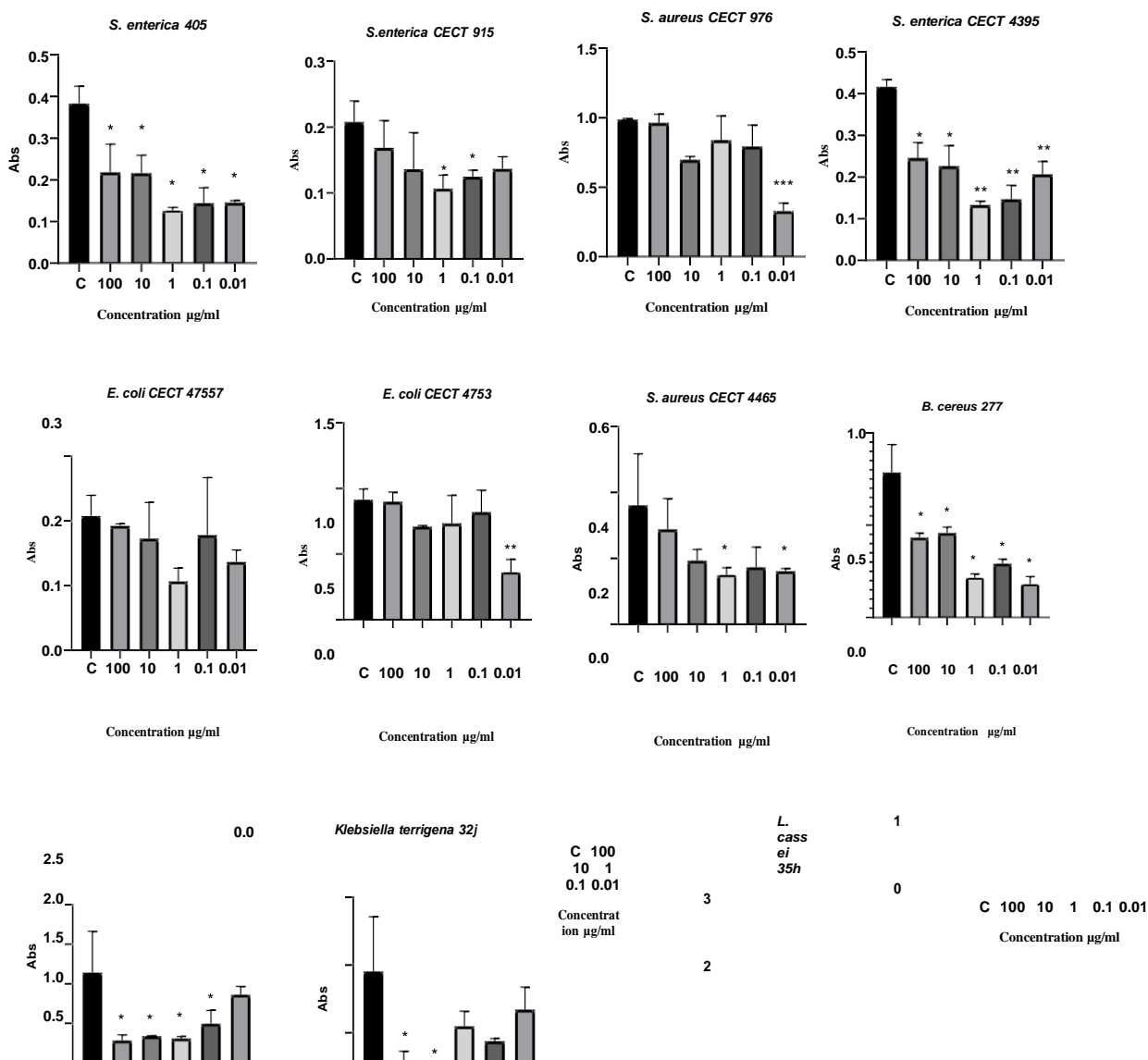
3. Resultados

Las pruebas fitoquímicas del extracto de *Sambucus canadensis* reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos (tabla 2). Las pruebas del espectro de infrarrojo (TFIR) del extracto vegetal mostró distintas frecuencias de estiramiento y flexión; las frecuencias de estiramiento del enlace O-H en 3350 cm^{-1} es asociado a grupos fenólicos, al estar involucradas en enlaces por puente de hidrógeno, se produce un ensanchamiento de la banda. Las vibraciones de estiramiento del enlace C-H correspondientes a los grupos metilo y metileno aparecen en un rango $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ y las bandas en la región de la huella dactilar se deben a las vibraciones de flexión en 1386 cm^{-1} para el metilo y 716 cm^{-1} para el etilo, las vibraciones de estiramiento del enlace carbonilo, C=O aparecen en un rango $1750\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la presencia de flavonoides. Asimismo, en un rango $1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ aparece un doble enlace conjugado C=C de los anillos aromáticos característico de la estructura base de los flavonoides.

Respecto a los resultados sobre la inhibición de la formación de biopelículas los resultados fueron variables para el caso de *S. enterica* CECT 915 en la concentración de 1.0 y 0.1 µg/ml se obtuvieron diferencias significativas respecto al control $p=0.0335$. Para el caso de *S. enterica* CECT 4395 en las concentraciones de 1 y 0.10 µg/ml se obtuvieron valores de 31 y

35% respectivamente siendo estadísticamente significativo $P < 0.0001$. Para la cepa *S. enterica* CECT 4300 los valores más bajos de formación de biofilm (49 y 50%) se lograron en las concentraciones más bajas 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$ pero no mostraron significancia estadística $P = 0.1542$. En el caso de *S. enterica* CECT 405 se obtuvieron valores estadísticamente significativos (37 y 32 % $P < 0.0001$) en concentraciones bajas de 1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$, las concentraciones más altas de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ tuvieron porcentajes alrededor del 50%. Para el caso de las bacterias *E. coli* CECT 4757 no se encontraron diferencias significativas $p = 0.1525$, el mayor porcentaje de inhibición fue mayor al 50%. Sin embargo, con la cepa *E. coli* CECT 4753 en la menor concentración 0.01 se redujo hasta en un 39% la formación de biofilm siendo estadísticamente diferente respecto al control $p = 0.0017$. Para las bacterias *S. aureus* CECT 976 y *S. aureus* CECT 4475 se logró una inhibición en la formación del biofilm del 33% y 41% en las concentraciones más bajas, ambas cepas mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control $p < 0.0001$ y $p = 0.0391$ respectivamente. Para el caso de las bacterias resistentes aisladas de alimentos ecológicos la cepa *Enterococcus faecium* 11c tuvo menor formación de biofilm en la concentración más baja 0.01 $\mu\text{g/ml}$ los resultados fueron estadísticamente significativos ($P = 0.106$). La cepa *Pantoea* 29o tuvo porcentajes de formación del 35%; a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ $p = 0.0007$. La bacteria *B. cereus* redujo hasta en 23% la formación de biofilm $P < 0.0001$. Sin embargo, la cepa de *Klebsiella* 32j tuvo menor inhibición en la formación de biofilm en la mayor concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (47%) los resultados fueron estadísticamente significativos respecto al control $P = 0.0025$. *L. cassei* redujo hasta en un 17% la formación de biofilm en las concentraciones más altas con resultados estadísticamente significativos $p = 0.0030$. Por otro lado, *Enterobacter* 37p no tuvo resultados favorables, la menor formación de biofilm fue 71% $p = 0.1453$ (figura 37). Respecto a los resultados en la disgregación del biofilm, se puede observar que en algunas bacterias se logró una disrupción de la biopelícula previamente formada menor al 30% (Tabla 2). Las bacterias pertenecientes a la colección tipo CECT la bacteria *S. enterica* CECT 915 obtuvo porcentajes de disgregación de 34% $p < 0.05$ en concentraciones de 0.10 $\mu\text{g/ml}$. Para el caso de *S. enterica* CECT 4357 también se tuvo disgregación de biofilm de 40% en la misma concentración. Por otro lado, para la cepa *S. enterica* CECT 4300 no se logró disgregación de biofilm. Para la cepa *E. coli* CECT 4757 se alcanzó hasta un 24% de disgregación en la concentración más baja de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ siendo

estadísticamente significativo respecto al control $P < 0.0001$. Para el caso de las bacterias *S. aureus* CECT 975 y *S. aureus* CECT 4465 se logró una disgregación de 30 y 24% a las concentraciones más bajas de 0.1 y 0.10 $\mu\text{g/ml}$ siendo estadísticamente significativo $p < 0.05$. Para el caso de las bacterias resistentes *E. faecium* 11c en las concentraciones intermedias (10 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la disgregación $p = 0.0019$. Por otro lado, la cepa de *Pantoea* 29o disgregó hasta en un 35% $p < 0.05$ en la concentración más baja de 0.01 $\mu\text{g/ml}$. Similares resultados se pueden observar para *Enterobacter* sp. 37p logrando una disgregación de hasta 25% en las concentraciones más bajas. La cepa *B. cereus* también mostró resultados positivos logrando romper la biopelícula hasta en 40% en concentraciones bajas $p = 0.0353$. Por otro lado, con la cepa de *Klebsiella terrigena* 32j, la menor disgregación se presentó en la concentración de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ $p = 0.016$ de manera similar en la cepa de *L. casei* 35h los valores de disgregación mostraron diferencias significativas respecto al control $p = 0.0002$.



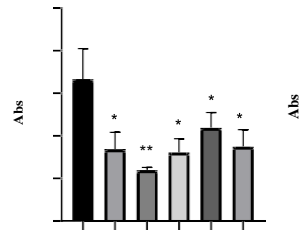
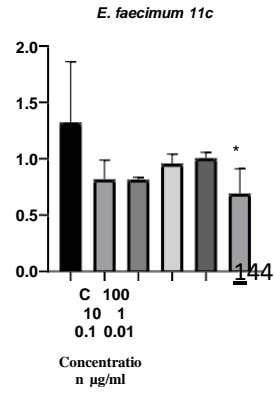
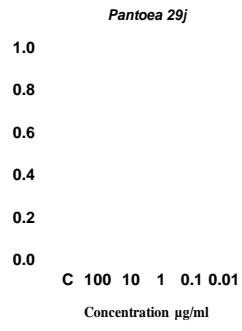


Figura 38. Resultados de la formación de biopelículas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

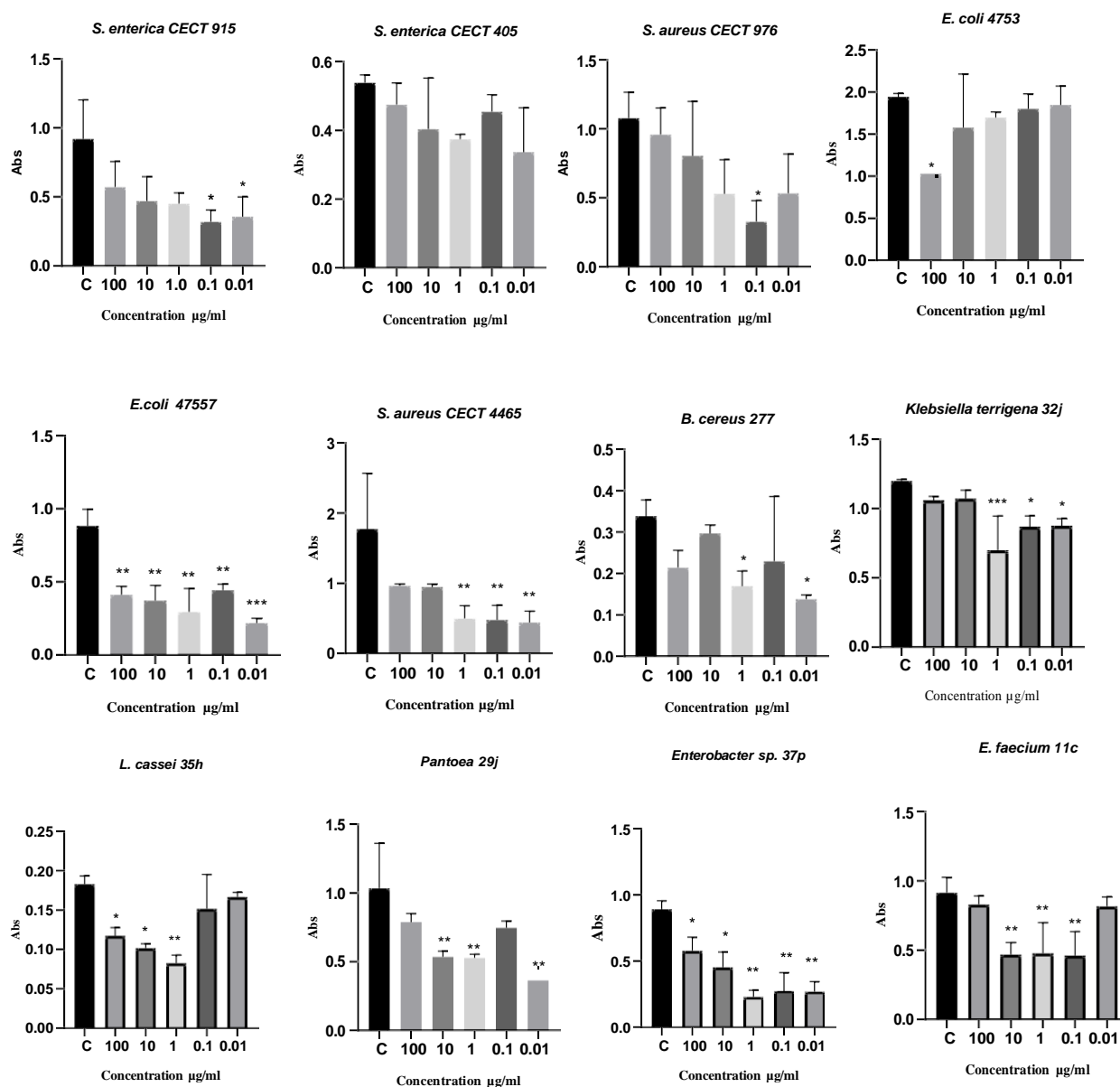


Figura 39. Resultados de la disgregación de biopelículas previamente formadas de 12 cepas aisladas de alimentos ecológicos. Se muestran las diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

4. Discusión

La alta resistencia desarrollada por las biopelículas bacterianas a los antibióticos y biocidas varía de un organismo a otro, por lo tanto, su erradicación no es fácil. Reducir la capacidad de que las bacterias formen biopelículas es fundamental para poder aplicar un tratamiento más eficaz (Dean et al., 2011, Ulrey et al., 2014). Algunos estudios desarrollados con productos naturales han demostrado que podrían ser eficaces contra las biopelículas bacterianas (Upadhyay et al., 2013, Alejo-Armijo et al., 2017, Vasudevan, 2014). A este respecto Budri et al. (2015) reportó una fuerte actividad anti-biopelícula de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*. Cha et al. (2004) también mostró que los aceites esenciales de *Artemisia lavandulaefolia*, tienen efectos inhibidores sobre 15 cepas de bacterias anaerobias entre las que se encuentran *S. aureus*, *Enterobacter sp.* entre otras. Yatsuda et al. (2005) encontró que los extractos de *Mikania laevigata* y *M. glomerata* inhibían significativamente la adherencia celular de *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. cricetus*. Del mismo modo, Veloz et al. (2005) mostró que los extractos de polifenoles de *Chilean propolis* inhiben un 50% la formación de biopelículas de *S. mutans*.

En este estudio se encontró que el extracto vegetal de *Sambucus canadensis* presenta resultados favorables frente a la formación de biopelículas y la disgregación de películas previamente formadas, estos resultados se presentaron tanto en bacterias de cultivo tipo como resistentes. Para el caso de algunas bacterias se encontró inhibición significativa pues hubo reducción menor al 30% e incluso aumento en la capacidad de formación de biopelículas dependiendo de la concentración probada. *B. cereus 27q* y *S. aureus CECT 976* obtuvo los menores porcentajes de formación de biofilm (30%, $p < 0,05$). Para el caso de la formación de biofilm de la cepa *S. enterica CECT 4465*, *Klebsiella terrigena 32j* y *L. casei 35h* se presentó una dosis dependiente, induciendo una disminución de 43 a 55% de 47% a 83% y de 23 a 70.4% respectivamente aumentando cuando la concentración incremento de 0.01 a 100 $\mu\text{g/mL}$. La dosis dependiente encontrado en la formación de biofilm ha sido reportada por microorganismos que afectan los alimentos (Rane et al., 2014, (Alejo-Armijo et al., 2016). Por otro lado, también se encontraron resultados en los cuales a menor concentración mayor actividad anti biopelícula, en otros estudios también se han reportado efectos paradójicos; menor formación de biofilm en concentraciones más bajas Rane et al (2014) al estudiar el efecto de las proantocianidinas (PAC) de arándano sobre la formación de biopelículas de *C.*

albicans encontró que las dosis altas de PAC de arándano no tuvieron un efecto significativo ($P > 0,05$) sobre la actividad de *C. albicans* pero si las dosis más bajas, también se había observado un efecto paradójico dependiente de la cepa y del fármaco (Melo et al., 2007). Posteriormente, en el experimento de disgregación cuando se permitió que las bacterias se adhieran y formen biopelículas, los mejores resultados se encontraron con la bacteria *S. aureus* que indujo una reducción del 24,8% ($p < 0,05$) a 0,01 ug / ml, en comparación con el control. También se detectó una reducción significativa ($p < 0,05$) del 35.2% en el biofilm preformado con *Pantoea 290* a la misma concentración. Asimismo, en *Enterobacter sp 37p* se redujo en 25% en una concentración de 1 ug/ml $p = 0.05$. También se detectaron reducciones menores en concentraciones de 1 y 10 ug/ml. Los resultados encontrados en el estudio pueden asociarse a los compuestos de las plantas; por ejemplo, los polifenoles tienden a autoasociarse cuando aumenta la concentración (Charlton et al., 2002). También las estructuras externas de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas pueden ser responsables del efecto dosis-dependiente. Los metabolitos secundarios de las plantas tienen diversas propiedades biológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiano, modulación de enzimas, entre otras (Kurmukov et al., 2013) y se les puede asociar la actividad de formación y disgregación encontrada en este estudio. El extracto de *Sambucus canadensis* presenta principalmente alcaloides, flavonoides, saponinas y terpenos, los resultados de este trabajo pueden deberse a los alcaloides los cuales se han reportado que inhiben la formación de biopelículas y dispersan las biopelículas bacterianas (Skogman et al., 2012). De acuerdo con Dwivedi et al. (2016) el alcaloide la Piperina, ha mostrado una actividad de inhibición de biopelícula contra *S. mutans*. Asimismo, el potencial antibiofilm se ha reportado anteriormente para especies que presentan cantidades importantes de flavonoides (Xie et al., 2012). Los resultados de este estudio pueden ser útiles para formular una propuesta de un producto natural derivado de fuentes vegetales que puede ser utilizado en la industria agroalimentaria. Asimismo, derivado del aumento de la resistencia microbiana de las biopelículas, los extractos vegetales ofrecen grandes oportunidades para desarrollar nuevos productos que puedan ser eficaces.

Referencias

Abdelmigid HM (2013) New insights into Toxicity and Drug Testing. Chapter 5. 89-253. <http://dx.doi.org/10.5772/54858>

Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Rejiniemon, T.S. 2015. In Vitro Antibacterial, Antifungal, Antibiofilm, Antioxidant, and Anticancer Properties of Isosteviol Isolated from Endangered Medicinal Plant *Pittosporum tetraspermum*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 11.

Adukwu, E. C., Allen, S. C. H., & Phillips, C. A. (2012). The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1217e1227

Bazargani, M. M., & Rohloff, J., Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms, *Food Control* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>

Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Rasmussen, T.B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H.P., Rygaard, J., Moser, C., Eberl, L., Høiby, N., Givskov, M., 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 151, 3873–3880

Budri, P.E.; Silva, N.C.C.; Bonsaglia, E.C.R.; Fernandes, A.; Araujo, J.P.; Doyama, J.T.; Goncalves, J.L.; Santos, M.V.; Fitzgerald-Hughes, D.; Rall, V.L.M. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2015, 98(9), 5899-5904

Caraher, E., Reynolds, G., Murphy, P., 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 26, 213–221

Cha, J.D.; Jeong, M.R.; Choi, H.J.; Jeong, S.; Moon, S.E.; Yun, S.; Kim, Y.H.; Kil, B.S.; Song, Y.H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*. *Planta Med.*, 2005, 71(6), 575-577.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Vol. 34. Document M100eS24, No. 3; CLSI: Wayne, PA, 2015.

Dwivedi, D.; Singh, V. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. *J Tradit Complement Med*, 2016, 6(1), 57-61

Donlan, R.M.; Costerton, J.W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2), 167-193

Elhariry, H., Abuzaid, A.A., Khiralla, G.M. & Gherbawy, Y. (2014). Antibiofilm formation and anti-adhesive (to HEp-2 cells) effects of rosemary water extract against some food-related patho- gens. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1132–1141

Fernández-Fuentes, M. A.; Ortega Morente, E.; Abriouel, H.; P?erez Pulido, R.; G?alvez, A. Isolation and Identification of Bacteria from Organic Foods: Sensitivity to Biocides and Antibiotics. *Food Control*. 2012, 26,73–78. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.01.017

Kot, B.; Wicha, J.; Piechota, M.; Wolska, K.; Gruzewska, A. Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropatho- genic *Escherichia coli*. *Turk. J. Med. Sci.*, 2015, 45(4), 919-924.

Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., and Nag, M. (2019). Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *J. Biosci.* 44:52. doi: 10.1007/s12038-019-9868-4

Naz, S., Jabeen, S., Llyas, S., Manzoor, F., Aslam, F., Ali, A., 2010. Antibacterial Activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of Bacteria. *Pak. J. Bot.* 42, 455-462

Ortega-Vidal, J., Cobo A., Ortega-Morente E., Gálvez A., Alejo-Armijo A., Salido S., Altarejos J. (2021) Antimicrobial and antioxidant activities of flavonoids isolated from wood of sweet cherry tree (*Prunus avium* L.), *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 41:2-3, 104-117, DOI: 10.1080/02773813.2021.1910712

Rudrappa, T., Bais H.P., 2008. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J Agric Food Chem.* 56(6) 1955–1962

Lee J, Finn CE. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 87: 2665–2675. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3029>

Sidor A, Gramza-Michałowska A (2014) Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food—areview, *J. funct foods.* 18:941–958. doi: 10.1016/j.jff.2014.07.012

Takarada, K.; Kimizuka, R.; Takahashi, N.; Honma, K.; Okuda, K.; Kato, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2004, 19(1), 61-64

Tedesco M, Kuhn AW, Frescura VD, Boligon AA, Athayde ML, Tedesco SB, Silva ACFD (2017). Assessment of the antiproliferative and antigenotoxic activity and phytochemical

screening of aqueous extracts of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. (Adoxaceae). *An. Acad Bras Cienc* 89(3):2141-2154. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720150138>

Pui CF., Wong, WC., Chai, LC., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, MS., Ubong, A., Farinazleen, MG., Cheah, YK., Son, R. 2011. Salmonella: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal*; 18: 465-473.

Ritter AC., Tondo, EC. 2014. Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travellers. Review Article. *J Infect Dev Ctries*; 8(3): 254-257.

Skogman, M.E, Kujala, J., Busygin, I., Leino, R., Vuorela, P.M., Fallarero, A., 2012. Evaluation of antibacterial and anti-biofilm activities of cinchona alkaloid derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Commun.*7, 1173–1176.

Sarkar, R., Chaudhary, S. K., Sharma, A., Yadav, K. K., Nema, N. K., Sekhoacha, M., ... Sen, T. (2014). Anti-biofilm activity of Marula – A study with the standardized bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(1), 170–175. doi:10.1016/j.jep.2014.03.067

Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., & Puripattanavong, J. (2017). Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(2), 172–177. doi:10.1016/j.jtcme.2016.06.007

Vasudevan, R., 2014. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 1(3), 1–16

Veloz, J.J.; Saavedra, N.; Lillo, A.; Alvear, M.; Barrientos, L.; Salazar, L.A. Antibiofilm activity of Chilean Propolis on *Streptococcus mutans* is influenced by the year of collection. *Biomed. Res. Int.*, 2015.

Yatsuda, R.; Rosalen, P.L.; Cury, J.A.; Murata, R.M.; Rehder, V.L.G.; Melo, L.V.; Koo, H. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 97(2), 183-189.

Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S (2004) Characterization of anthocyanins and procyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem* 52: 7846-7856.

WHO (World Health Organization) 2016 WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Ginebra, Switzerland.

Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S (2004) Characterization of anthocyanins and procyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem* 52: 7846-7856.